

公告本

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※申請案號：091134426 ※IPC分類：A61K35/22

※申請日期：91年11月27日

壹、發明名稱

(中文) 由雌馬尿液提取雌激素之方法

(英文) Verfahren zur Gewinnung von Oestrogenen aus Stutenharn

貳、發明人 (共 2 人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 海茨-黑爾默·拉薛

(英文) Heinz-Helmer Rasche

住居所地址：(中文) 德國 31303 布格多夫市齊勒路 54 號

(英文) Zilleweg 54, 31303 Burgdorf, GERMANY

國籍：(中文) 德國 (英文) GERMANY

參、申請人 (共 1 人)

申請人 1 (如發明人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 德商索爾威製藥有限公司

(英文) Solvay Pharmaceuticals GmbH

住居所或營業所地址：(中文) 德國 30173 漢諾威市漢斯-柏克萊路

20 號

(英文) Hans-Böckler-Allee 20, 30173 Hannover,
GERMANY

國籍：(中文) 德國 (英文) GERMANY

代表人：(中文) 馬汀·歌斯曼博士

(英文) Dr. Martin Gosmann

續發明人或申請人續頁 (發明人或申請人欄位不敷使用時，請註記並使用續頁)

發明人 2

姓名：(中文) 歐拉夫·盧普

(英文) Olaf Rupp

住居所地址：(中文) 德國 31553 奧哈根市英姆邦普 6 號

(英文) Im Pump 6, 31553 Auhagen, GERMANY

國籍：(中文) 德國 (英文) GERMANY

發明人 3

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

發明人 4

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

發明人 5

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

發明人 6

姓名：(中文)

(英文)

住居所地址：(中文)

(英文)

國籍：(中文) (英文)

捌、聲明事項

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： _____

本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

- 1. _____
- 2. _____
- 3. _____

主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

- 1. 德國；2001年12月1日；DE 101 59 161.6
- 2. _____
- 3. _____
- 4. _____
- 5. _____
- 6. _____
- 7. _____
- 8. _____
- 9. _____
- 10. _____

主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

- 1. _____
- 2. _____
- 3. _____

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

- 1. _____
- 2. _____
- 3. _____

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

- 1. _____
- 2. _____
- 3. _____

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

陸、(一)、本案指定代表圖為：第_____圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

本案無圖式

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

本發明係關於一種由懷胎雌馬之尿液中提取結合型雌激素之天然混合物。

雌激素在醫學上係用作荷爾蒙療法。雌激素之混合物尤其使用作為治療及預防出現於婦女身上之自然或人工停經後之更年期病痛。在此，結合型雌激素之天然混合物，如同其存在於懷胎雌馬之尿液中，係證明特別有效而且相容性良好。

在懷胎雌馬之尿液中溶解之固體物質含量(= 懷胎雌馬之尿液，以下縮寫成“PMU”)在自然方式下可以擺動在很廣之範圍內，而且一般介於每公升 40 至 90 公克乾燥物質之範圍內。除了尿素及其他一般尿液內含物質以外，在懷胎雌馬之尿液之固體物質含量中，酚類物質組成成份含有大約占乾燥物質之 2 至 5 個重量百分比。在該等酚類物質組成成份中，有甲酚(Kresole)以及作為 HPMF 之習知之二氫氧基-3,4-二[(3-氫氧基苯基)甲基]-2(3 氫)-呋喃酮(Dihydro-3,4- bis[(3-hydroxyphenyl)methyl]-2(3H)-furanon)。其可以游離型或結合型存在。在懷胎雌馬之尿液中含有雌激素之天然混合物，其進一步以結合型，例如以硫酸半酯-鈉鹽存在(以下縮寫成「硫酸鹽(Sul-fatsalz)」)。結合型雌激素之含量(以雌激素硫酸鹽計算)，可達到占乾燥物質之 0.3 至 1 個重量百分比之間。

由專利案 WO 98/08526 中習知有一種適用之方法，藉其以一種於半極性，尤其是非離子性之半極性聚合性吸附樹脂上之固相萃取，可以提取到一種尿液內含少量之酚類物質、甲酚以及 HPMF 含量大幅降低，且實際上完全含有懷胎雌馬之尿液天然雌激素-含量之混合物。該萃取物適合作為合成藥物之起始物質，其含有結合型雌激素之天然混合物作為主成份。

為使用作為藥物主成份，所提取得到之結合型雌激素之天然混合物，必須要滿足某些製藥上之規格，例如符合在 USP(美國藥典)或歐洲藥典所規定之規格。甚至於非結合型雌激素占乾燥物質之含量，應該不可超過特定之臨界值。在正常情況下，根據專利案 WO 98/08526 之方法，由懷胎雌馬之尿液所提取得到之結合型雌激素混合物，係滿足該提出之製藥規格之要求。

然而卻發現到，例如上述之非結合型雌激素最大容忍量之臨界值，在當一「老化」之尿液，例如一存放或運送經過一段較長時間及/或可能於溫度提高下之懷胎雌馬之尿液，使用作為提取結合型雌激素之天然混合物時，常常不能遵循所要求之製藥規格。該懷胎雌馬之尿液之老化現象很可能可追溯之原因為，根據存放及/或運送之條件，結合型雌激素之含量會隨著時間或是溫度之升高而減少，而不想要之非結合型雌激素含量結果卻增加。因此雌激素天然混合物之原始組成因此相對於新鮮尿液，在老化之尿液會產生不良之改變。根據專利案 WO 98/08526 之方法所提取得到之結合型雌激素混合物，在起始產物老化可能使組成改變下常常有此危險，即所提取得到之萃取物不再能夠遵循製藥上所要求之規格，尤其是非結合型雌激素之最大容忍量。特別不利之處在於，從老化之懷胎雌馬之尿液中所提取得到之含有原本有價值之結合型雌激素混合物主成份-萃取物之原料，不再能使用作為藥劑之製備，而因此必須丟棄。損棄有價值之製藥用天然主成份，在耗費人力以及僅能於懷孕某一特定時期才可進行懷胎雌馬之尿液採集工作，而且與其相關邏輯性實際周邊條件之理由及經濟之觀點下，是相當無法令人服氣。

因此，本發明之任務在於，發展出一種在技術上與經濟上最

適合之方法，由懷胎雌馬之尿液中提取一種尿液中內含少量酚類物質之結合型雌激素天然混合物，其中甚至作為起始產物之老化之懷胎雌馬之尿液，亦即存放或運送經過一段較長時間及/或在溫度升高下之懷胎雌馬之尿液，其可能具有含量增加之非結合型雌激素，也一定可以使用而不必丟棄任何材料，而且其中尤其是由此懷胎雌馬之尿液所提取得到之結合型雌激素天然混合物，具有良好之主成份含量且滿足製藥上所要求之規格，特別是在非結合型雌激素之最大容忍量方面。

此時發現到一種方法，藉該方法以簡單至令人驚訝之方式，也可以從老化，亦即是尤其從一種可能具有含量增加之非結合型雌激素之懷胎雌馬之尿液中，提取出結合型雌激素混合物，在此所提取得到之結合型雌激素混合物具有高度之產物品質，而且一定滿足製藥上規格之要求，特別是在非結合型雌激素之最大容忍量方面。

根據本發明之方法，是由專利案 WO 98/08526 所述之方法出發，其作為自懷胎雌馬之尿液中提取一種尿液內含少量酚類物質之結合型雌激素天然混合物之用。據此，本發明係關於一種用以從懷孕之雌馬尿液中，提取一種尿液內含少量酚類物質之結合型雌激素天然混合物，其中

- a) 將一尿液，其可能為一不含黏液及固體物質之尿液、一該尿液之濃縮液，或一藉由薄膜過濾該尿液所得之濃縮尿液滯留物，接觸一份量充足之半極性聚合吸附樹脂，以吸附尿液中所含有之結合型雌激素混合物，並且將吸附之結合型雌激素混合物之半極性聚合吸附樹脂與其他尿液分開，
- b) 將吸附之結合型雌激素混合物之半極性聚合吸附樹脂，以一調

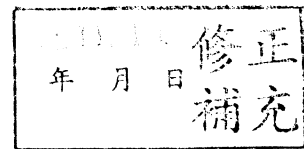
整至 pH 值範圍至少為 12.0，尤其是從 12.5 至 14.0 之清洗液洗滌，

- c) 將洗滌過之吸附樹脂接觸一份量足以卸下吸附其上之結合型雌激素混合物之沖提液，其為一藉由水可相溶之有機溶劑，由藉由水可相溶之醚類、低碳數醇類以及低碳數直鏈脂肪酮類組，或一由可藉由水相溶之有機溶劑，與有需要時被調至鹼性之水所組成之混合液，並且將含有該結合型雌激素天然混合物與該吸附樹脂分開，且於有需要時濃縮，在此根據本發明之方法相對於目前技術水準之方法係突顯出

在方法步驟 b)與 c)之間有一中間洗滌，其中該吸附之結合型雌激素混合物之半極性吸附樹脂係用純水洗滌。

裝料準備工作，已習知之方法步驟 a)、b)及 c)，以及利用方法步驟 c)中獲得到之沖提物，其含有結合型雌激素天然混合物，大體上已於國際專利申請案 WO 98/08526 中有所描述，而且該公開之專利申請案係為專業人士所習知。該專利案 WO 98/08526 之內容係為公開成果而做，也為成為本申請案之標的而做。其他一般性方法與可使用材料之細節係概述於本申請案之範例部份。例如根據專利案 WO 98/08526 可以使用半極性，尤其是非離子之半極性吸附樹脂。除此之外，根據本發明之方法，令人驚訝地也可以將其他吸附樹脂與根據本發明之中間洗滌一起使用，而不會對產物之品質或所須遵循之製藥規格產生不利之影響。在本發明範圍之內，可以使用之吸附樹脂將繼續在以下之敘述中進一步說明。

根據本發明，方法步驟 a)中吸附之結合型雌激素混合物之半極性吸附樹脂係在方法步驟 b)中，緊接著以純水之中間洗滌來洗滌。所使用於洗滌之水量係如此選擇，即在緊接下來之方法步驟



c)中所得之沖提物具有結合型雌激素混合物，滿足非結合型雌激素最大含量之要求，而且因此可以作為藥劑之主成份使用。例如每個床體積吸附樹脂使用 2 至 8，尤其是 3 至 5 個床體積之清洗液係證明是適當的。在此，該清洗液以適當之方式以每小時 1 體積份量吸附樹脂，以 3 至 10、較偏好為 5 至 7 個體積份量清洗液之流通速度，而引導通過一含有該吸附樹脂之反應器。

必須要作為相當令人訝異之處為，該在方法步驟 b)與 c)之間被錯認為簡單之用水洗滌吸附樹脂，甚至當使用老化之懷胎雌馬之尿液時，也得到最適化以主成份-萃取物方式提取得到結合型雌激素天然混合物製藥規格之結果，就如同根據本發明所確定之。尤其相當令人驚訝之處為，該主要可能含於老化懷胎雌馬之尿液中所增加之非結合型雌激素量能夠如此確定被減少，而使得在方法步驟 c)中能夠以沖提物方式得到一種天然結合型雌激素混合物，其滿足製藥規格之高度要求，例如根據 USP 或歐洲藥典所提之要求，尤其也可從老化之懷胎雌馬之尿液中獲得到一種含有天然結合型雌激素-混合物，且在質與量上高效價之主成份-萃取物。該主成份-萃取物確實遵循非結合型雌激素最大可容忍之最高含量，而與所使用懷胎雌馬之尿液時間之長久以及來源無關，其因此證明為有利或有製備藥劑價值之起始產物。一種不希望發生而且又不利於經濟之損棄有價值之製藥用原料，如天然結合型雌激素之混合物，係因此亦可於困難之條件下避免。

根據本發明之方法發現另一項之優點為，在方法步驟 c)中所提取到之沖提物，相較於目前之技術水準，所獲得之乾燥物質具有增加之總荷爾蒙含量。由此獲得例如在主成份含量方面明顯改善之品質產物。

在根據本發明方法之一項有利之作法中，該中間洗滌係於低於室溫之溫度下操作，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，因其顯示出藉由該額外之中間洗滌而可能造成之荷爾蒙或主成份之損失可以明顯地減少。通常環境之溫度係視為室溫，例如一介於攝氏 20 度至攝氏 30 度間之溫度係稱為室溫。非常適當之作法為，該於溫度為真實攝氏 0 度或接近攝氏 0 度時操作該方法。因此，在實際上建議在接近攝氏 0 度以上之溫度下操作，而且設法透過適當之辦法以維持所謂之溫度範圍。在此可以用原本常用降低溫度之辦法，例如使用冷卻過之反應器、冷卻過之材料及/或冷卻過之起始物質如懷胎雌馬之尿液。在實際之觀點下，從攝氏 0 度至大約攝氏 5 度，尤其是從攝氏 0 度至大約攝氏 3 度之溫度範圍可視為溫度為攝氏 0 度或接近攝氏 0 度。

為使荷爾蒙於中間洗滌時所產生可能之損失儘可能維持在少量，根據本發明之變化，將中間洗滌中及/或方法步驟 b)中所使用之調成鹼性之清洗液預先冷卻至室溫以下之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度。其他適當或較受偏好之溫度範圍如前所述為從攝氏 0 度至大約攝氏 5 度，尤其是從攝氏 0 度至大約攝氏 3 度之溫度。較受偏好者為在攝氏 0 度或接近攝氏 0 度之溫度操作，也就是說尤其是將中間洗滌中及/或方法步驟 b)中所使用之調成鹼性之清洗液，預先冷卻至接近攝氏 0 度以上之溫度。例如為了避免在加入冷卻清洗液做中間洗滌時，會發生同樣清洗液不希望發生之再升溫現象，藉由在方法步驟 b)中使用冷卻之調成鹼性之清洗液，便可達到一種使吸附樹脂預先冷卻，或維持已經產生之冷卻。因此較偏好者為，在相同之溫度範圍內操作中間洗滌以及其前述之方法步驟 b)，例如在室溫以下之溫度，尤其是介

於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，或主要在上文中所述之溫度範圍內。

在本發明前述之另一種變化中，其中該方法係於室溫以下之溫度操作，使用根據該方法預先冷卻至室溫以下之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，或在上述主要之溫度範圍之所有使用之裝置，如用以填裝半極性吸附樹脂之反應器或已經填裝該樹脂之反應器，及/或所要使用之懷胎雌馬之尿液，可能是一件被希望做到之事。

適合於作為根據本發明之方法之吸附劑者為聚合性吸附樹脂。特別受到偏好之吸附樹脂為半極性、尤其是非離子之半極性聚合吸附樹脂。在根據本發明方法中作為吸附劑使用之半極性聚合吸附樹脂，主要為多孔性有機非離子聚合物，其與非極性忌水性聚合吸附樹脂不同之處為具有一中間極性(= 例如該樹脂活性表面之電偶極範圍從 1.0 至 3.0，尤其是從 1.5 至 2.0 Debye)，而且具有一少許親水性之結構，例如聚羧基酸酯類樹脂。符合該目的者為使用主要為大網狀結構，而且有平均孔隙直徑範圍從 50 至 150，主要從 70 至 100 埃(Angström)，以及比表面積範圍從 300 至 900，主要從 400 至 500 m²/g 之大孔性半極性樹脂。證明特別適用者為大孔性交錯結合之直鏈型聚羧基酸酯類樹脂，尤其是交錯結合之聚丙烯醛酯樹酯，例如 Rohm 與 Haas 公司之 Amberlite XAD-7^R，其為非離子之半極性吸附樹脂。

除了該等較偏好之列舉之吸附劑以外，其他吸附樹脂也可以使用。在此，適合作為吸附樹脂使用者不僅有非極性、半極性，而且還有極性之吸附樹脂。尿液用量，其可以由該吸附樹脂所抽吸，此時必須事先根據各種吸附樹脂之吸納量來決定。可以使用

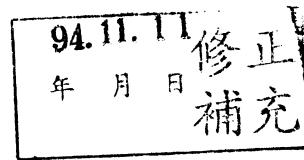
作為吸附樹脂之範例有市場上一般常見之類型，如具有苯乙烯二乙烯苯(Styroldivinylbenzol)基礎骨架結構(例如 XAD-1180, XAD-2, XAD-4, XAD-16 等類型)、具有丙烯醛酯(Acrylester)基礎骨架結構(例如 XAD-7)之聚合式 Amberlite 吸附劑，或該等含有氮原子及氧原子高極性基礎骨架結構(例如 XAD-12)之吸附劑。其他吸附樹脂有 Dowex-樹脂(為苯乙烯及二乙烯苯之異分子聚合物)，如 Dowex 112、Dowex Optipore、Dowex Optipore V 493；Lewatite(為交叉結合之聚苯乙烯)，例如 Lewatit OC 1064、Lewatit OC 1066 或 Lewatit OC 1163、聚胺類陰離子交換樹脂，例如 Dowex-樹脂。較有用處之樹脂係特別為 XAD-7、XAD-16 (HP 型)、XAD 118 及 Dowex Optipore，較偏好為 Dowex Optipore V 493，以及 Lewatite OC 1064、OC 1066 及 OC 1163。

根據本發明之方法，如上已詳細描述，相對於目前之技術水準顯現出許多優點與改進。所以，本發明可使得利用甚至老化之 PMU 懷胎雌馬之尿液成為可能，其可能具有份量增加之非結合型雌激素，而不會危及到所要遵循之製藥規格。根據本發明之方法因此亦具備經濟上之優點，因為有價值之主成份沒有遵循製藥規格，例如在非結合型雌激素不能容忍之含量時，其之危險性會明顯地減少。根據本發明之方法係提供一種品質改善，荷爾蒙含量占乾燥物質含量增加之主成份物質。該主成份物質相當適合使用於製備藥劑，其含有作為主成份之天然結合型雌激素混合物。

以下之範例係進一步詳細說明本發明，而不會限制其範圍。

範例

在下列範例中係敘述一般用以從懷胎雌馬之尿液中提取主成份-萃取物之作業方法，其具有包含在懷胎雌馬之尿液中結合型雌



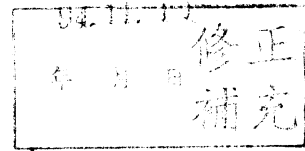
激素之天然混合物，而且已大幅減少尿液內含酚類物質。其顯示出，根據本發明，甚至從老化之懷胎雌馬之尿液，其可能含有含量提高之非結合型雌激素，也可以提取到高含量主成份之品質萃取物。

WO 98/08526 之方法

同樣如根據專利案 WO 98/08526，懷胎雌馬之尿液以如此之形式，一種由懷胎雌馬之尿液經由濃縮而得到之濃縮液，或一種由懷胎雌馬之尿液經由薄膜過濾而得到之滯留液也可以為根據本發明之方法所用。該所收集到之尿液首先以原本熟悉之方式除去黏液物質及固體物質。適當之作法為，使黏液物質及固體物質沈澱，然後根據習知之分離方法，例如將溶液之上清液輕輕倒出、分離及/或過濾等方式將該等物質去除。因此，懷胎雌馬之尿液例如可以被導引流經一套習知之分離裝置，例如一分離器、一過濾裝置或一沈澱器等。可以作為分離裝置使用者例如有砂床，或可使用市場上常見之分離器，例如噴嘴分離器或小房間分離器。若有需要時也可以使用微濾裝置或超濾裝置，在使用該裝置時可以同時大幅去除過濾懷胎雌馬之尿液之細菌及病毒。

若有需要時可以在該尿液中加入防腐劑、殺微生物劑、殺菌劑及/或驅蟲劑。

倘若不是使用懷胎雌馬之尿液，而是一種高度濃縮之懷胎雌馬之尿液-滯留液時，則該源自懷胎雌馬之尿液之滯留液可以藉由習知之薄膜過濾法取得。該滯留液之固體物質含量及其組成，會視所使用之懷胎雌馬之尿液以及作為薄膜過濾法使用之薄膜，例如其孔隙寬度以及過濾條件而有所變化。例如當使用一種孔徑為



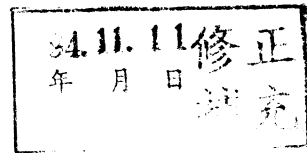
毫微大小之過濾薄膜時，可以達到將雌激素含量幾乎無損失地濃縮至懷胎雌馬之尿液-滯留液中，並同時去除直達 50 個重量百分比之低分子懷胎雌馬之尿液-內容物質。懷胎雌馬之尿液-滯留液可以為根據本發明之方法所用，其濃縮達到比例為大約 1:10，例如比例大約為 1:7，且其體積可由此濃縮至大約原來懷胎雌馬之尿液-體積之 1/10，例如大約 1/7。

可以在方法步驟 a) 中使用之半極性聚合吸附樹脂，係為多孔性有機非離子聚合物，其與非極性忌水性聚合吸附樹脂不同之處為，其具有一中間極性(= 例如該樹脂活性表面之電偶極之範圍從 1.0 至 3.0，尤其是從 1.5 至 2.0 Debye)，而且具有一少許親水性之結構，例如聚羧基酸酯類樹脂。符合該目的者為，使用有主要為大網狀結構而且有平均孔隙直徑範圍從 50 至 150，尤其是 70 至 100 埃，以及比表面積範圍從 300 至 900，尤其是 400 至 500 m²/g 之大孔性半極性樹脂。被證明特別適用者為大孔性交錯結合之直鏈型聚羧基酸酯類樹脂，尤其是交錯結合之聚丙烯醛酯樹脂，例如 Rohm 與 Haas 公司之 Amberlite XAD-7^R。

使結合型雌激素吸附於半極性吸附樹脂上可以根據專利案 WO 98/08526，亦如根據本發明之方法，藉由使懷胎雌馬之尿液或其滯留液與該吸附樹脂接觸而發生，其方法係將尿液注入於一含有吸附樹脂之反應器中，並在其內使之與吸附樹脂保持接觸一段足使雌激素被吸附之時間。當結合型雌激素完成吸附於半極性吸附樹脂之後，該被吸附之結合型雌激素混合物之吸附樹脂，便可以用習知之方式與其他之尿液分離。適當之作法為，將尿液以如此之流通速度導引流經一含有吸附樹脂之管柱，使其有充足之接觸時間使結合型雌激素被吸附。合適者例如為流通速度，其相當

於一個流通量為每小時每 1 個體積份量之吸附樹脂從 3 至 10 個，特別是 5 至 7 個體積份量懷胎雌馬之尿液。適當之作法為藉由在稍為超過壓力之上或在壓力下操作，以操控尿液流經反應器之流通速度。所使用半極性吸附樹脂之用量，可以依所用吸附樹脂之種類以及尿液中固體物質之含量做變化。於使用懷胎雌馬之尿液時，例如 1 個體積份量之吸附樹脂，諸如交錯結合之直鏈型聚羧基酸酯類-吸附樹脂，可以吸附達 80 個體積份量之前述處理過之懷胎雌馬之尿液，而不會在流出之尿液中檢驗出有明顯含量之雌激素。當使用懷胎雌馬之尿液-濃縮液或懷胎雌馬之尿液-滯留液時，該吸附樹脂之吸附力會自然減少至該等液體所濃縮之程度。所以，例如 1 個體積份量之交錯結合直鏈型聚羧基酸酯類-吸附樹脂，可以吸附相當於 20 至 80，尤其是 30 至 50 個體積份量懷胎雌馬之尿液之尿液量。

該被吸附之結合型雌激素混合物之半極性吸附樹脂，在方法步驟 b) 中係用一種調整至 pH-範圍至少為 12.0，尤其是從 12.5 至 14，特別偏好約為 12.5 至 13.5 之清洗液洗滌。可以作為清洗液使用者係為可溶於尿液惰性鹼性物質之水溶液，其足夠強烈，可使 pH-值達到至少 12.5。適合作為對半極性聚合吸附樹脂呈惰性之水溶性鹼性物質者主要為水溶性無機鹼，如鹼金族或鹼土族金屬之氫氧化物，尤其是氫氧化鈉。適當之作法為，該清洗液含有僅只約如此之鹼性物質份量，其需要達到所要之 pH-值，特別大約為 pH 13。清洗液之用量要如此選擇，以使得其足夠將尿液內含酚類物質大幅地加以移除，並使其在此不會使結合型雌激素值得被提及之含量一起洗掉。被證明適當者為，例如每個床體積吸附樹脂使用 2 至 10 個，尤其是 4 至 6 個床體積之清洗液。在此適當之作



法為沖提液以每小時每 1 個體積份量之吸附樹脂從 3 至 10 個，特別是 5 至 7 個體積份量沖提液之流通速度，導引流經一具有吸附樹脂之反應器。

在方法步驟 c) 中，該吸附之結合型雌激素混合物之吸附樹脂被清洗過後，接下來以一足以沖提出結合型雌激素混合物之沖提液份量處理，並且提取得到一含有懷胎雌馬之尿液結合型雌激素混合物之沖提液。根據本發明所使用之沖提液，係為一種藉水可相溶之有機溶劑、為藉水可相溶之醚類、低碳數醇類以及低碳數直鏈脂肪酮類組，或一種由該可藉水相溶之有機溶劑，與有需要時被調至鹼性之水所組成之混合液。適合作為沖提液之醚類組成份者為，藉水可相溶之環狀結構醚類，如四氫呋喃 (Tetrahydrofuran) 或二噁烷 (Dioxan)，但也有藉水可相溶之非環狀直鏈結構醚類，如乙二醇二甲醚 (= Monoglyme)、二乙二醇二甲醚 (= Diglyme)、或乙氧基乙氧基乙醇 (= 卡必醇 (Carbitol))。適合作為低碳數醇類者為，藉水可相溶之含有 1 至 4 個、較偏好為 1 至 3 個碳原子之烷基醇類，特別是乙醇和異丙醇。適合作為低碳數直鏈型酮類者為，藉水可相溶之含有 3 至 5 個碳原子之酮類，尤其是丙酮。而被證明特別有利者為沖提液，其中有機溶劑為乙醇。符合該目的者為，將由一種前述與水可相溶之有機溶劑，以及必要時調至鹼性之水所形成之混合液作為沖提液使用。該含水沖提液之 pH-值從中性直至 pH 13 之鹼性範圍，而且大約在 10 至 12 可較為有利。而一種在所使用之 pH-範圍呈穩定之溶劑，則選擇作為含水鹼性沖提液中之溶劑成份。在 pH-值約為 10 至 12 之含水鹼性沖提液中，適合於作為溶劑成份者為低碳數醇類，特別是乙醇。該含水沖提液所要求之 pH-值係藉由加入一適當量之水溶性惰性



鹼性物質，特別是一種無機鹼，例如一種鹼金族或鹼土族金屬之氫氧化物，尤其是氫氧化鈉而調整。在含水之沖提液中，藉水可相溶之有機溶劑與水之體積比從 40：60 至 20：80 之範圍，尤其大約為 30：70。而所加入之沖提液用量可以為每個床體積吸附樹脂大約 3 至 10 個，尤其是大約在 4 至 6 個之床體積。適當之作法為，將沖提液以如此之流通速度導引流經一個具有被雌激素吸附之吸附樹脂之反應器，而使得該接觸時間足以令結合型雌激素混合物完全沖提出來。當使用乙醇與水以 30：70 之體積比之混合液時，例如流通速度適合每小時每 1 個體積份量之吸附樹脂從 3 至 10 個，較偏好為 5 至 7 個體積份量之沖提液。適當之作法為，該沖提步驟在室溫至大約攝氏 60 度，較偏好為約攝氏 40 度至攝氏 50 度之溫度範圍進行。有需要時，藉由在壓力稍為提高下操作，例如超壓至 0.2 bar 來調節該流通速度，並且以數個分割液方式收取該沖提液，每個沖提分割液含有結合型雌激素及尿液內含酚類物質，如甲酚以及 HPMF 之含量可根據習知之方式，藉由高效能液體層析儀(= high performance liquid chromatography，簡稱為“HPLC”)來測定。

在沖提時，首先得到一顏色很淡至無色、實際上不含雌激素之先行流出之部份分割液，其量一般大約相當於一個床體積。結合型雌激素之主要量，例如介於存在起始-懷胎雌馬之尿液中結合型雌激素之 80 至 99% 之間，位於接下來顏色呈深黃色-棕色之主要沖提部份分割液中，其量一般包含 2 至 4 個床體積。在接下來後面流出之部份分割液當中，一般還僅含有些微之結合型雌激素。倘若當得到後面流出之部份分割液，其仍有結合型雌激素含量占乾燥物質超過 10 個重量百分比，而甲酚以及 HPMF 占乾燥物

質少於 0.6 個重量百分比時，可以將該等分割液與具有大量結合型雌激素之主要沖提液合併在一起以往下繼續處理。

範例 1 (比較性範例)：

a) 將懷胎雌馬之尿液中所含之雌激素吸附於半極性聚丙烯醛酯-吸附樹脂

將 300 ml 在水中膨脹過之半極性聚丙烯醛酯-吸附樹脂(= Rohm 與 Haas 公司所生產之 Amberlite XAD-7，顆粒大小為 0.3 至 1.2 mm，電偶極為 1.8 Debye，孔隙平均直徑為 80 埃，比表面積乾燥時大約為 $450 \text{ m}^2/\text{g}$)充填入一高度為 220 mm、管直徑為 40 mm 之管柱中。將 10.5 公升(= 35 個床體積)藉由超濾裝置過濾之 PMU 懷胎雌馬之尿液(由 HPLC 測定出雌酮硫酸鹽(Oestrone-sulfat)與甲酚之含量，請見後續範例列表)在室溫下以平均每分鐘 24 ml 之流通速度(= 每小時 4.8 個床體積)導引流經該管柱。懷胎雌馬之尿液中所含之雌激素完全吸附在如此充填之半極性吸附樹脂-管柱之上。流出來之尿液藉由 HPLC 檢測其結合型雌激素之含量(以雌酮硫酸鹽計算)，結果證明實際上不含雌激素。該流出之尿液遂被丟棄。

b) 清洗該被吸附之吸附樹脂-管柱

該被吸附之吸附樹脂-管柱以 1.5 公升、pH-值 13 之氫氧化鈉水溶液清洗。在此，鹼性之清洗液以平均每分鐘 24.6 ml 之流通速度(= 每小時 4.9 個床體積)導引流經該管柱。流出來之清洗液以 HPLC 檢測其雌酮硫酸鹽與甲酚之含量。檢驗結果顯示出於洗滌期間少於 5% 之總共加至該管柱之雌激素被清洗出來。

c) 使結合型雌激素從清洗過之吸附樹脂-管柱脫離

將 1.5 公升沖提液(乙醇/水 30:70)以每分鐘 25 ml 之流速(= 每小時 5.0 個床體積)導引通過預先加熱至範例附表中所述沖提溫度之管柱。流出來之沖提液係分成 5 個分割液收集。該分割液每個有 300 ml (= 1 個床體積), 並以 HPLC 檢測其雌酮硫酸鹽與甲酚之含量。

第一個分割液僅含有微量之雌酮硫酸鹽。該沖提液呈現無色至淡黃色。然後接下來第 2 個至第 4 個分割液大約含有總共在該管柱上被吸附之雌激素含量之 80 至 98%。該等沖提液在此具有濃烈深棕色之色調。最後一個分割液僅含有微量之雌激素硫酸鹽, 其也可以明顯看見顏色強度減少。

含有結合型雌激素主要含量之分割液, 係在下列附表中表列出每種 TS-重量百分比含量, 以及由 HPLC 所檢測出雌酮硫酸鹽與甲酚之含量。該等分割液適合作為以蓋倫方式進一步處理之萃取物。

d) 吸附樹脂-管柱之再生

欲再生時, 將該管柱首先用 600 ml 調成含有 50% 乙醇之乙醇/水-混合物, 然後用 600 ml 調成含有 70% 乙醇之乙醇/水-混合物, 接著再用 600 ml、10% 之檸檬酸鈉水溶液, 最後用 600 ml 之蒸餾水清洗。整個再生過程在攝氏 45 度之溫度下進行。該管柱可以吸附多次, 例如達 40 次, 而且又再生復元。

範例 2 (根據本發明之方法)

雌酮	mg/l	0.0
馬烯雌酮	mg/l	20.9
甲酚	mg/l	18.0
洗滌分割液 2 :	比較：中間洗滌	
雌酮	mg/l	125.0
馬烯雌酮	mg/l	0.0
甲酚	mg/l	0.0
洗滌分割液 3 :		
雌酮	mg/l	290.6
馬烯雌酮	mg/l	138.0
甲酚	mg/l	31.5

方法步驟 c) :		
沖提液	乙醇/水 30 : 70	乙醇/水 30 : 70
沖提溫度	攝氏 45 度	攝氏 45 度
沖提分割液 1 :		
重量百分比 TS	4.3	0.2
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	0.0 (0.00)	342.7 (17.14)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	24.8 (0.06)	182.6 (9.13)
沖提分割液 2 :		
重量百分比 TS	1.9	0.9
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	2788.6 (14.68)	2053.5 (22.81)

續次頁 (發明說明頁不敷使用時，請註記並使用續頁)

馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	1528.0 (8.04)	1120.1 (12.45)
沖提分割液 3 :		
重量百分比 TS	0.2	0.2
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	193.2 (9.66)	38.9 (1.95)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	99.8 (4.99)	19.8 (0.99)
沖提分割液 4 :		
重量百分比 TS	0.1	0.1
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	7.1 (0.71)	0.0 (0.00)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	9.3 (0.93)	0.0 (0.00)

範例 3 (根據本發明冷卻之方法) :

於中性清洗時減少荷爾蒙之損失

其如同於範例 1 與 2，但卻在冷卻下操作。冷卻之作用在於將荷爾蒙於清洗期間之損失減至最低。倘若中間洗滌不是在室溫下，而是以冰水操作時，則荷爾蒙之損失可以被降至大約 50% 左右，尤其是當在本方法中溫度為真正攝氏 0 度或是接近攝氏 0 度時。在此，係建議不僅要加入冰水，而且是要使整支管柱冷卻在攝氏 0 度，其由於存在於室溫下之管柱內容物質緣故會相當快地升溫。

實驗操作

中間洗滌所需要之攝氏 0 度管柱溫度，係藉由前述鹼性洗滌步驟時之冷卻而達到，也就是說鹼性洗滌步驟已經在攝氏 0 度下

進行。5 個攝氏 0 度床體積在鹼性洗滌之任務，在此足以使管柱內容物質從室溫冷卻至攝氏 0 度。緊接其後之中間洗滌隨後即可在攝氏 0 度下進行。除了使荷爾蒙之損失減至最低以外，溫度在鹼性洗滌步驟期間對於甲酚分離可能之影響也一同被研究。

為直接比較而做兩個試驗：

範例 3a：

於室溫下進行鹼性洗滌與中間洗滌。

範例 3b：

於攝氏 0 度下進行鹼性洗滌與中間洗滌。

其他所有步驟皆按標準方法進行如上述中在專利案 WO 98/08526 所述之方法，或在範例 1 與 2 中所述之方法。

試驗結果

附表 III 呈現在室溫下以及將溫度調整至攝氏 0 度時之試驗參數以及試驗結果。

該試驗之結果可以明顯看出，其

- a) 藉由將溫度調整至攝氏 0 度沒有對鹼性洗滌造成不利之影響，即去除甲酚。甲酚被大量去除。附表 III 提供一概略之結果。
- b) 在中間洗滌期間之荷爾蒙損失因溫度降低而減少大約 50% 左右。附表 II 提供一個概略結果。

附表 II 荷爾蒙損失以及其藉由在攝氏 0 度下中間洗滌而使損失減至最低

範例編號	3a	3b
------	----	----

	室溫 (T = 約攝氏 25 度)	冰水 (T = 約攝氏 0 度)
雌酮	2.7 重量百分比	1.8 重量百分比
馬烯雌酮	3.4 重量百分比	1.4 重量百分比

溫度調整至大約攝氏 0 度之氫氧化鈉水溶液，在鹼性洗滌時之任務在此提供一單純之可能性，即在沒有對甲酚之去除有不利之影響下，藉由在大約攝氏 0 度下之操作也同樣降低中間洗滌之荷爾蒙損失。

在中間洗滌期間將溫度降至大約攝氏 0 度可以使損失減至最低成為可能，亦即說將因額外中間洗滌所造成無可避免之荷爾蒙損失減少至大約 50% 左右。

如果在中間洗滌之前進行之鹼性洗滌同樣亦於大約攝氏 0 度下進行時，於中間洗滌期間調整管柱之溫度即可以用簡單之方式達到。而在鹼性洗滌時所發生之甲酚去除作用不會受到溫度降低而有負面之影響。

附表 III

根據本發明之方法於室溫下與冷卻下之操作

範例編號	3a 室溫 (T = 約攝氏 25 度)	3b 冰水 (T = 約攝氏 0 度)

方法步驟 a) :		
起始 - 懷胎 雌馬之尿液		
雌酮 mg/l	64.9	65.4
馬烯雌酮 mg/l	57.9	57.6
甲酚 mg/l	329.0	333.0
方法步驟 b) :		
清洗液 = 氫氧化鈉水溶液	pH 13	PH 13
洗滌分割液 1 :		
雌酮 mg/l	4.4	1.7
馬烯雌酮 mg/l	0.0	1.6
甲酚 mg/l	55.1	51.6
洗滌分割液 2 :		
雌酮 mg/l	28.8	27.9
馬烯雌酮 mg/l	31.5	24.8
甲酚 mg/l	6942.5	7011.0
洗滌分割液 3 :		
雌酮 mg/l	0.0	0.0
馬烯雌酮 mg/l	11.5	18.3
甲酚 mg/l	2215.2	2774.0
洗滌分割液 4 :		

94.11.11	修正
年 月 日	補充

雌酮 mg/l	0.0	0.6
馬烯雌酮 mg/l	0.0	3.2
甲酚 mg/l	280.6	268.6
洗滌分割液 5 :		
雌酮 mg/l	0.0	0.0
馬烯雌酮 mg/l	0.0	0.0
甲酚 mg/l	76.6	44.1
洗滌分割液 1 至 5 之荷爾蒙 損失		
雌酮	1.5 %	1.3 %
馬烯雌酮	2.1 %	2.4 %

中間洗滌：		
清洗液 = 水		
洗滌分割液 1 :		
雌酮 mg/l	0.0	0.0
馬烯雌酮 mg/l	0.0	0.0
甲酚 mg/l	22.8	19.4
洗滌分割液 2 :		
雌酮 mg/l	13.3	8.2
馬烯雌酮 mg/l	9.7	5.9

甲酚	mg/l	33.2	11.8
洗滌分割液 3 :			
雌酮	mg/l	48.0	32.0
馬烯雌酮	mg/l	58.3	23.3
甲酚	mg/l	76.0	0.0
洗滌分割液 1 至 3 之荷爾蒙 損失			
雌酮		2.7 %	1.8 %
馬烯雌酮		3.4 %	1.4 %

方法步驟 c) :		
沖提液	乙醇/水 30 : 70	乙醇/水 30 : 70
沖提溫度	攝氏 45 度	攝氏 45 度
沖提分割液 1 :		
重量百分比 TS	0.2	0.2
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	76.0 (3.80)	58.0 (2.90)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	65.8 (3.29)	48.2 (2.41)
沖提分割液 2 :		
重量百分比 TS	1.0	0.9
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	1237.0 (12.37)	1145.6 (12.73)

馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	1093.8 (10.94)	1135.0 (12.61)
沖提分割液 3 :		
重量百分比 TS	0.4	0.5
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	607.8 (15.20)	840.0 (16.80)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	524.7 (13.12)	748.4 (14.97)
沖提分割液 4 :		
重量百分比 TS	0.1	0.1
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	84.6 (8.46)	144.6 (14.46)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	58.2 (5.82)	107.4 (10.74)
甲酚 mg/l (重量百分比 TS)	0.0 (0.00)	0.0 (0.00)
沖提分割液 5 :		
重量百分比 TS	0.1	0.1
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	21.1 (2.11)	34.3 (3.43)
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	7.5 (0.75)	17.9 (1.79)
沖提分割液 6 :		
雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	9.0	15.2
馬烯雌酮 mg/l (重量百分比 TS)	0.0	3.4

範例 4 (減少非結合型荷爾蒙之含量)

根據前述範例 1 至 3 之試驗方法，係研究在使用根據本發明之方法時，非結合型荷爾蒙之含量如何被減少。在下列附表 IV a

中列出為沒有中間洗滌之比較性試驗之結果，以及在附表 IV b 中列出根據本發明有中間洗滌之試驗之結果。

附表 IV 將非結合型荷爾蒙減少至最低：

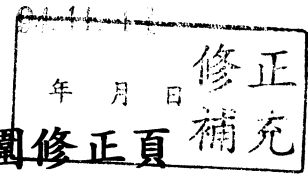
附表 IV a 沒有中間洗滌之比較性試驗

	在濃縮液中非結合型 雌激素之含量	在濃縮液中結合型雌激素 占乾燥物質含量之總含量
	(重量百分比)	(重量百分比)
試驗 1	3.21	3.2
試驗 2	3.67	4.4
試驗 3	2.38	9.2
試驗 4	4.14	12.2
試驗 5	4.03	9.9

附表 IV b 具有中間洗滌之試驗(根據本發明)

	在濃縮液中非結合型 雌激素之含量	在濃縮液中結合型雌激素 占乾燥物質含量之總含量
	(重量百分比)	(重量百分比)
試驗 6	0.0	25.2
試驗 7	0.77	17.2
試驗 8	0.35	23.9
試驗 9	0.20	29.3

試驗 10	0.0	27.7
-------	-----	------

**第 091134426 號專利案申請專利範圍修正頁****肆、中文發明摘要**

本發明係關於一種從懷胎雌馬之尿液(PMU)中，提取一種結合型雌激素天然混合物萃取物之方法。根據本發明提取得到之萃取物，係滿足有關結合型雌激素製藥上之規格，而且將非結合型雌激素之含量減至最低，當老化及/或於溫度升高時，使用存放或運送之雌馬尿液時亦相同。從懷胎雌馬之尿液中提取含有結合型雌激素混合物之萃取物，係藉由在半極性吸附樹脂上固相萃取而完成。

伍、英文發明摘要

Es wird ein Verfahren zur Gewinnung von Extrakten aus einem natürlichen Gemisch konjugierter Oestrogene aus dem Harn trächtiger Stuten (PMU) beschrieben. Die erfindungsgemäß gewonnenen Extrakte erfüllen die pharmazeutische Spezifikation in Bezug auf konjugierte Oestrogene und die Minimierung des Gehaltes an freien Oestrogenen, auch wenn alter und/oder bei erhöhten Temperaturen gelagerter oder transportierter Harn trächtiger Stuten eingesetzt wird. Die Gewinnung der ein Gemisch konjugierter Oestrogene enthaltenden Extrakte aus dem PMU erfolgt durch Festphasenextraktion an semipolaren Adsorberharzen.

第 091134426 號專利案申請專利範圍修正本

拾、申請專利範圍

1. 一種從懷胎雌馬之尿液中提取一尿液內含少量酚類物質之結合型雌激素天然混合物之方法，
 - a) 將一尿液，其可為一不含黏液及固體物質之尿液、一該尿液之濃縮液，或一藉由薄膜過濾該尿液所得到之濃縮液滯留液，接觸一份量充足之半極性聚合吸附樹脂，以吸附尿液中所含有之結合型雌激素混合物，並且將吸附之結合型雌激素混合物之半極性聚合吸附樹脂與其他尿液分開，
 - b) 將吸附之結合型雌激素混合物之半極性聚合吸附樹脂，以一調整至 pH 值範圍至少為 12.0 之清洗液洗滌，以及
 - c) 將洗滌過之吸附樹脂接觸一份量足以卸下吸附其上之結合型雌激素混合物之沖提液，其為一藉由水可相溶之有機溶劑，由藉由水可相溶之醚類、低碳數醇類以及低碳數直鏈脂肪酮類組，或一由可藉由水相溶之有機溶劑，與有需要時被調為鹼性之水所組成之混合液，以卸下吸附其上之結合型雌激素混合物，並且將含有該結合型雌激素天然混合物與該吸附樹脂分開，並且於有需要時濃縮，
其特徵為，在方法步驟 b) 與 c) 之間有一中間洗滌，該吸附之結合型雌激素混合物之半極性吸附樹脂係用純水洗滌。
2. 根據申請專利範圍第 1 項所述之方法，其特徵為，該中間洗滌係於低於室溫之溫度下，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度下，最好是在接近攝氏 0 度以上之溫度來進行。
3. 根據申請專利範圍第 2 項所述之方法，其特徵為，中間洗滌所使用之清洗液，係預先冷卻至低於室溫之溫度，尤其是介於攝

氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是接近攝氏 0 度以上之溫度。

4. 根據申請專利範圍第 1 項所述之方法，其特徵為，在方法步驟 b) 中使用調為鹼性之清洗液，其預先冷卻至低於室溫之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是接近攝氏 0 度以上之溫度。
5. 根據申請專利範圍第 1 項所述之方法，其特徵為，中間洗滌以及前述之方法步驟 b) 係於低於室溫之溫度下，尤其是在介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是在接近攝氏 0 度以上之溫度進行。
6. 根據申請專利範圍第 5 項所述之方法，其特徵為，中間洗滌所使用之清洗液，係預先冷卻至低於室溫之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是接近攝氏 0 度以上之溫度。
7. 根據申請專利範圍第 5 項所述之方法，其特徵為，在方法步驟 b) 中使用調為鹼性之清洗液，其預先冷卻至低於室溫之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是接近攝氏 0 度以上之溫度。
8. 根據申請專利範圍第 6 項所述之方法，其特徵為，在方法步驟 b) 中使用調為鹼性之清洗液，其預先冷卻至低於室溫之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是接近 0°C 以上之溫度。
9. 根據申請專利範圍第 1 項所述之方法，其特徵為，所使用之裝置，如用以填裝聚合性吸附樹脂之反應器，或已具有該樹脂之反應器及/或所要使用之懷胎雌馬之尿液，係預先冷卻至室溫

以下之溫度，尤其是介於攝氏 0 度至攝氏 10 度間之溫度，最好是接近攝氏 0 度以上之溫度。

10. 根據申請專利範圍第 1 項所述之方法，其特徵為，使用半極性吸附樹脂作為聚合性吸附樹脂，最好是使用非離子半極性吸附樹脂。