



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 125**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/22** (2006.01)  
**A61K 38/22** (2006.01)  
**C07J 75/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02787839 .6**  
86 Fecha de presentación : **27.11.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1453527**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de estrógenos a partir de orina de yeguas.**

30 Prioridad: **01.12.2001 DE 101 59 161**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Solvay Pharmaceuticals GmbH**  
**Hans-Böckler-Allee 20**  
**30173 Hannover, DE**

72 Inventor/es: **Rasche, Heinz-Helmer y**  
**Rupp, Olaf**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 268 125 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de estrógenos a partir de orina de yeguas.

5 La presente invención se refiere a la obtención de una mezcla natural de estrógenos conjugados a partir de la orina de yeguas preñadas.

10 Los estrógenos se utilizan en medicina para la terapia de sustitución hormonal. Se usan, en particular, mezclas de estrógenos para el tratamiento y la profilaxis de los trastornos del climaterio femenino que se producen después de una menopausia natural o artificial, para cuyo tratamiento las mezclas naturales de estrógenos conjugados que existen en la orina de yeguas preñadas han resultado ser especialmente eficaces y bien toleradas.

15 La cantidad de sólidos disueltos en la orina de yeguas preñadas (= pregnant mares' urine, abreviado en lo sucesivo como PMU) puede variar naturalmente dentro de amplios límites y, en general, se encuentra en un intervalo de 40 a 90 g de sustancia seca por litro. Además de urea y otros componentes habituales de la orina, las sustancias sólidas de la orina de yeguas preñadas contienen componentes fenólicos en la proporción de aproximadamente 2 a 5% en peso con relación a la sustancia seca. Entre estos componentes fenólicos se encuentran los cresoles y la dihidro-3,4-bis[(3-hidroxifenil)metil]-2(3H)-furanona, abreviada como HPMF. Estos pueden existir en forma libre o conjugada. En la PMU está contenida una mezcla natural de estrógenos, que existe preponderantemente en forma conjugada, por ejemplo como sal sódica del semiestér de ácido sulfúrico (denominada a continuación en forma abreviada como "sal sulfato"). El contenido en estrógenos conjugados (calculado como sal sulfato de estrógeno) puede hallarse entre 0,3 y 1% en peso, con relación a sustancia seca.

25 En el documento WO 98/08526 ya se describe un procedimiento adecuado mediante el cual, en una extracción en fase sólida sobre una resina adsorbente semipolar, particularmente una resina adsorbente polímera semipolar no iónica, puede obtenerse una mezcla que contiene prácticamente en su totalidad el contenido de estrógenos naturales de la orina de yeguas preñadas y que está empobrecida en componentes fenólicos de la orina y, particularmente, casi exenta de cresoles y HPMF. Este extracto es adecuado como material de partida para la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen la mezcla natural de estrógenos conjugados como componente activo.

30 Para poder ser utilizada como componente activo para productos farmacéuticos, la mezcla natural de estrógenos conjugados así obtenida debe cumplir, sin embargo, determinadas especificaciones farmacéuticas, por ejemplo las especificaciones de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) o de la Farmacopea Europea. La concentración de estrógenos libres con relación a sustancia seca tampoco debe superar determinados límites. Normalmente, las especificaciones farmacéuticas exigidas son cumplidas por la mezcla de estrógenos conjugados obtenida a partir de la PMU por el procedimiento del documento WO 98/08526.

40 Sin embargo, se ha verificado que frecuentemente no pueden cumplirse las especificaciones farmacéuticas exigidas, por ejemplo el límite arriba citado del contenido máximo tolerable de estrógenos libres, si para la obtención de la mezcla natural de estrógenos conjugados se utiliza una orina "envejecida", por ejemplo una PMU que ha sido almacenada o transportada durante un tiempo prolongado y/o, eventualmente, a temperaturas más elevadas. Este envejecimiento de la PMU probablemente se debe a que de acuerdo a las condiciones de almacenaje y/o transporte el contenido en estrógenos conjugados puede disminuir en función del tiempo o a temperaturas elevadas, mientras que aumenta, en consecuencia, el contenido en estrógenos libres indeseables. Por lo tanto, la composición original de la mezcla natural de estrógenos puede modificarse en forma inconveniente en la orina envejecida en relación con la orina fresca. Para la mezcla natural de estrógenos conjugados obtenida por el procedimiento según el documento WO 98/08526 existe frecuentemente el riesgo, con una composición eventualmente modificada de un producto de partida envejecido, de que el extracto obtenido ya no cumpla las especificaciones farmacéuticas exigidas, particularmente el contenido máximo tolerable de estrógenos libres. Un inconveniente particular reside en que los lotes obtenidos a partir de PMU envejecida, y que contienen el valioso extracto de sustancias activas de la mezcla de estrógeno conjugados, ya no pueden ser utilizados para la fabricación de una preparación farmacéutica y deben ser desechados. La pérdida de una valiosa sustancia activa farmacéutica natural es altamente insatisfactoria del punto de vista económico, teniendo en cuenta la costosa recolección de PMU que solamente puede llevarse a cabo en determinados períodos de la preñez, y las condiciones marginales logísticas resultantes de ello en la práctica.

55 En consecuencia, la misión según la presente invención es la de desarrollar un procedimiento técnica y económicamente óptimo para la obtención de una mezcla natural de estrógenos conjugados empobrecida en componentes fenólicos de la orina, a partir de PMU, en el cual puede utilizarse como material de partida, de forma segura y sin desperdicios, también una PMU envejecida, es decir, una PMU que ha sido almacenada o transportada durante períodos prolongados y/o a temperaturas elevadas, y que eventualmente puede contener una mayor proporción de estrógenos libres, procedimiento mediante el cual particularmente la mezcla natural de estrógenos conjugados obtenida a partir de este tipo de PMU tenga un buen contenido en sustancia activa y cumpla con las especificaciones farmacéuticas exigidas, particularmente también en lo que respecta al contenido máximo tolerable en estrógenos libres.

65 Se ha hallado ahora un procedimiento mediante el cual, de forma sorprendentemente sencilla, puede obtenerse una mezcla de estrógenos conjugados, inclusive a partir de una PMU envejecida, es decir, a partir de una orina que eventualmente tiene mayor proporción de estrógenos libres, obteniéndose una mezcla de estrógenos conjugados de

## ES 2 268 125 T3

alta calidad y que satisface eficazmente las especificaciones farmacéuticas exigidas, particularmente también en lo que respecta al contenido máximo tolerable en estrógenos libres.

5 El procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en el procedimiento descrito en el documento WO 98/08526, destinado a la obtención de una mezcla natural de estrógenos conjugados empobrecida en componentes fenólicos de la orina a partir de la PMU. En consecuencia, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una mezcla natural de estrógenos conjugados empobrecida en componentes fenólicos de la orina, a partir de la orina de yeguas preñadas, en el cual

10 a) un líquido urinario, que eventualmente comprende un líquido urinario exento de sustancias mucilaginosas y sólidos, un concentrado de este líquido urinario o un retentato concentrado de este líquido urinario, obtenido por filtración por membrana, se pone en contacto con una cantidad de una resina adsorbente polímera semipolar suficiente para la adsorción de la mezcla de estrógenos conjugados contenida en el líquido urinario, separándose del resto de líquido urinario remanente la resina adsorbente polímera semipolar cargada con la mezcla de estrógenos conjugados.

15 b) la resina adsorbente polímera semipolar cargada con la mezcla de estrógenos conjugados se lava con un agua de lavado ajustada a un intervalo de pH de al menos 12,0, particularmente de 12,5 hasta 14,0,

20 c) la resina adsorbente lavada se pone en contacto con un líquido eluyente en cantidad suficiente para la desorción de la mezcla de estrógenos conjugados adsorbida, en donde el líquido eluyente está constituido por un disolvente orgánico miscible con agua, seleccionado del grupo que comprende éteres, alcanoles inferiores y cetonas alifáticas inferiores miscibles con agua, o una mezcla del disolvente orgánico miscible con agua y agua eventualmente alcalinizada, en donde se separa y, eventualmente, se concentra a partir de la resina adsorbente un eluato que contiene la mezcla natural de estrógenos conjugados, en donde el procedimiento según la presente invención se distingue del procedimiento según el estado de la técnica porque entre las etapas b) y c) se lleva a cabo un lavado intermedio, en el cual la resina adsorbente semipolar cargada con la mezcla de estrógenos conjugados se lava con agua.

La preparación de los lotes, las etapas de procedimiento en sí conocidas a), b) y c), así como el uso del eluato obtenido en la etapa de procedimiento c) que contiene una mezcla de estrógenos conjugados naturales ya están descritas de manera general en la solicitud de patente internacional WO 98/0826, y por lo tanto son conocidas para los expertos en la técnica a partir de esta solicitud de patente publicada. A los efectos de la publicación, el contenido de este documento WO 98/08526 también se incorpora en el objeto según la presente invención. Otras particularidades del procedimiento general y los materiales a utilizar se resumen en la sección de ejemplos de la presente solicitud. Por ejemplo, de acuerdo con el documento WO 98/08526 se pueden utilizar resinas adsorbentes semipolares, en especial resinas adsorbentes semipolares no iónicas. Adicionalmente, y de forma sorprendente, de acuerdo con el procedimiento según la presente invención también es posible utilizar otras resinas adsorbentes junto con el lavado intermedio según la presente invención, sin afectar a la calidad del producto ni a las especificaciones farmacéuticas que se deben satisfacer. Las resinas adsorbentes utilizables dentro del contexto según la presente invención se explican con mayor detalle más adelante en la descripción.

40 De acuerdo con la presente invención, la resina adsorbente semipolar cargada con la mezcla de estrógenos conjugados en la etapa de procedimiento a) se lava con agua en una etapa de lavado intermedio subsiguiente a la etapa de procedimiento b). La cantidad de agua de lavado se selecciona de tal manera que el eluato obtenido en la etapa de procedimiento c) subsiguiente contenga una mezcla de estrógenos conjugados que satisfaga las exigencias de contenido máximo en estrógenos libres y que, por lo tanto, pueda ser utilizada como componente activo para productos farmacéuticos. Ha resultado conveniente, por ejemplo, el uso de 2 a 8, y preferentemente de 3 a 5 volúmenes de lecho de agua de lavado por volumen de lecho de resina adsorbente. El agua de lavado se hace pasar convenientemente a través de un reactor que contiene la resina adsorbente con una velocidad de circulación de 3 a 10 partes por volumen, preferentemente 5 a 7 partes por volumen de agua de lavado por 1 parte por volumen de resina adsorbente y por hora.

50 Debe considerarse particularmente sorprendente el hecho de que una etapa de lavado con agua, aparentemente sencilla, de la resina adsorbente entre las etapas de procedimiento b) y c) produzca tal optimización de las especificaciones farmacéuticas de la mezcla natural de estrógenos conjugados obtenida como extracto de sustancias activas, incluso al utilizar PMU envejecida, como se ha comprobado de acuerdo con la presente invención. En especial, resulta muy sorprendente que la mayor proporción de estrógenos libres que se observa, sobre todo en la PMU envejecida, puede disminuirse con seguridad de tal manera que en la etapa de procedimiento c) se obtiene como eluato una mezcla natural de estrógenos conjugados que satisface las elevadas exigencias de las especificaciones farmacéuticas, por ejemplo los requisitos impuestos por la USP o la Farmacopea Europea, y que permite obtener incluso a partir de PMU envejecida un extracto de sustancia activa que contiene la mezcla natural de estrógenos conjugados y que cualitativa y cuantitativamente es de elevada calidad. Estos extractos de sustancia activa mantienen de manera segura el contenido máximo tolerable en estrógenos libres, independientemente del envejecimiento y procedencia de la PMU utilizada y, por lo tanto, resulta un material de partida conveniente y valioso para la preparación de productos farmacéuticos. Por lo tanto, incluso bajo condiciones difíciles, es posible evitar la pérdida indeseable y económicamente inconveniente de valiosas materias primas farmacéuticas, como es, en este caso, la mezcla de estrógenos conjugados naturales.

Otra ventaja del procedimiento según la presente invención reside en que el eluato obtenido en la etapa de procedimiento c) tiene un contenido total de hormonas, con respecto a la sustancia seca, mayor que la que se obtiene según

## ES 2 268 125 T3

el estado de la técnica. Esto permite obtener un producto de calidad, notablemente mejorado, por ejemplo, en lo que se refiere al contenido en sustancia activa.

5 En una realización conveniente del procedimiento según la presente invención, el lavado intermedio se lleva a cabo a temperaturas menores que la temperatura ambiente, particularmente a temperaturas entre 0°C y 10°C, ya que se ha verificado que las eventuales pérdidas de hormonas o sustancias activas, eventualmente resultantes del lavado intermedio adicional, pueden disminuirse en forma apreciable. Se considera como temperatura ambiente, generalmente, la temperatura meteorológica, por ejemplo una temperatura entre 20°C y 30°C. Es muy conveniente llevar a cabo el procedimiento a temperaturas de 0°C o próximas a 0°C. Por lo tanto en la práctica es conveniente trabajar a tempe-  
10 raturas superiores a, pero muy cercanas a 0°C. En la práctica, se recomienda, por lo tanto, trabajar a temperaturas ligeramente superiores a 0°C, procurando los medios adecuados para mantener estos intervalos de temperaturas. Para esto, se pueden aplicar los recursos habituales para disminuir la temperatura, por ejemplo, la utilización de reactores enfriados, de materiales enfriados y/o de materiales de partida enfriados, tales como la PMU. Como temperatura de 0°C o cercana a 0°C puede considerarse, desde el punto de vista práctico, un intervalo de temperatura de 0°C a 5°C,  
15 particularmente 0°C a 3°C.

Para mantener al mínimo posible la pérdida de hormonas durante el lavado intermedio, de acuerdo con esta variante según la presente invención, el agua alcalinizada utilizada en el lavado intermedio y/o en la etapa de procedimiento b) puede estar preenfriada a temperaturas menores que la temperatura ambiente, particularmente a temperaturas entre 0°C  
20 y 10°C. Otros intervalos de temperatura convenientes o preferidos son las temperaturas arriba indicadas de 0°C hasta aproximadamente 5°C, particularmente 0°C hasta aproximadamente 3°C. Preferentemente, se trabaja a temperaturas de 0°C o próximas a 0°C, es decir, preferentemente el agua alcalinizada del lavado intermedio y/o el agua de lavado en la etapa de procedimiento b) se preenfriaba a temperaturas mayores que, pero próximas a 0°C. Mediante el uso de agua de lavado alcalinizada enfriada en la etapa de procedimiento b) ya se logra una especie de pre-refrigeración o  
25 mantenimiento de la refrigeración previa de la resina adsorbente, por ejemplo para evitar que al utilizar agua de lavado enfriada para el lavado intermedio se produzca un recalentamiento indeseable de la misma. Preferentemente, el lavado intermedio y la etapa de procedimiento precedente se llevan a cabo, por lo tanto, en el mismo intervalo de temperatura, por ejemplo a temperaturas menores que la temperatura ambiente y, en especial, a temperaturas entre 0°C y 10°C, o preferentemente dentro de los intervalos de temperatura anteriormente indicados.  
30

En la presente variante de la invención, en la cual el procedimiento se lleva a cabo a temperaturas menores que la temperatura ambiente, puede ser deseable que todos los dispositivos utilizados, tales como los reactores para contener la resina adsorbente semipolar o los reactores que ya la contienen y/o la PMU usada, se utilicen ya preenfriados a  
35 temperaturas menores que la temperatura ambiente, particularmente a temperaturas entre 0°C y 10°C o en los intervalos de temperatura anteriormente indicados.

Como adsorbentes para el procedimiento según la presente invención son adecuadas las resinas adsorbentes po-  
líméricas. Las resinas adsorbentes particularmente preferidas son resinas adsorbentes semipolares, particularmente re-  
sinas adsorbentes polímeras semipolares no iónicas. Las resinas adsorbentes polímeras semipolares utilizables como  
40 adsorbentes en el procedimiento según la presente invención son, preferentemente, polímeros orgánicos porosos no iónicos que, al contrario que las resinas adsorbentes polímeras no polares hidrófobas, tienen una polaridad intermedia (= por ejemplo, con un momento bipolar de la superficie activa de la resina en el intervalo de 1,0 hasta 3,0, parti-  
cularmente 1,5 hasta 2,0 Debyes) y que tienen una estructura algo más hidrófila, por ejemplo, resinas de ésteres de  
45 ácidos policarboxílicos. Convenientemente, se utilizan resinas semipolares macroporosas, preferentemente con estructura macrorreticular, con un diámetro promedio de poros en el intervalo de 50 a 150, y preferentemente 70 a 100 Angström, y una superficie específica en el intervalo de 300 a 900, y preferentemente 400 a 500 m<sup>2</sup>/g. Han resultado particularmente adecuadas las resinas de ésteres de ácidos policarboxílicos alifáticos macroporosas transversalmente  
reticuladas, particularmente resinas de ésteres poliacrílicos transversalmente reticuladas, como por ejemplo, Amberlite  
XAD-7<sup>R</sup> de la empresa Rohm und Haas, que representan resinas adsorbentes semipolares no iónicas.  
50

Además de estos adsorbentes preferidos, también pueden utilizarse otras resinas adsorbentes. Como resinas adsor-  
bentes son adecuadas tanto las resinas adsorbentes no polares, las semipolares, como también las polares. La cantidad  
de orina que puede ser bombeada a través del adsorbente debe determinarse previamente sobre la base de la correspon-  
diente capacidad adsorbente. Como ejemplo de resinas adsorbentes utilizables se pueden citar los tipos habituales en  
55 el comercio, tales como adsorbentes Amberlite polímeros con estructuras fundamentales de estireno-divinilbenceno (por ejemplo tipos XAD-1180, XAD-2, XAD-4, XAD-16), estructuras fundamentales de éster acrílico (por ejemplo, XAD-7), o con estructuras fundamentales de alta polaridad que contienen nitrógeno y oxígeno (por ejemplo, XAD-12). Otras resinas adsorbentes son resinas Dowex (copolímeros de estireno y divinilbenceno), tales como, por ejemplo, Dowex 112, Dowex Optipore, Dowex Optipore V 493; Lewatite (poliestirenos reticulados), por ejemplo Lewatit OC  
60 1064, Lewatit OC 1066, o Lewatit OC 1163, resinas de intercambio aniónicas poliamínicas, tales como, por ejemplo, resinas Dowex. Resinas adsorbentes convenientes son, en especial, XAD-7, XAD-16 (tipo HP), XAD 118 y Dowex Optipore, preferentemente como Dowex Optipore V 493, así como Lewatite OC 1064, OC 1066 y OC 1163.

El procedimiento según la presente invención, como ya se ha descrito detalladamente más arriba, ofrece una serie  
65 de ventajas y mejoras con relación al estado de la técnica. De esta forma, la invención permite el uso también de PMU envejecida, que también puede contener una mayor proporción de estrógenos libres, sin que exista el riesgo de no poder mantener las especificaciones farmacéuticas exigidas. El procedimiento según la presente invención presenta, por lo tanto, también ventajas económicas porque disminuye de manera destacable el riesgo de perder sustancias activas

valiosas al no mantener las especificaciones farmacéuticas, por ejemplo, con contenidos no tolerables en estrógenos libres. El procedimiento según la presente invención proporciona un componente de sustancia activa de mayor calidad con un contenido en hormonas incrementado con relación al contenido en sustancia seca. Este componente de sustancia activa es excelente para la preparación de productos farmacéuticos que contienen una mezcla de estrógenos conjugados naturales.

Los siguientes ejemplos deben explicar más detalladamente la invención, aunque sin limitar su alcance.

### Ejemplos

En los siguientes ejemplos se indican especificaciones de trabajo generales para la obtención de extractos de sustancia activa a partir de PMU que contienen la mezcla natural de estrógenos conjugados contenidos en la PMU y que está apreciablemente empobrecida en componentes fenólicos de la orina. Se demuestra la manera en que, de acuerdo con la presente invención, se puede obtener también a partir de PMU envejecida, que puede exhibir una mayor proporción de estrógenos libres, un extracto de alta calidad con elevados contenidos en sustancia activa.

#### *Procedimiento según el documento WO 98/08526*

En el procedimiento según la presente invención, al igual que en el documento WO 98/08526, se puede utilizar como PMU un concentrado obtenido por concentración, o un retentado obtenido por filtración a través de una membrana. La orina acumulada se depura, en primer lugar, de forma en sí convencional para separar mucílago y sólidos. Convenientemente, se dejan sedimentar los sólidos y sustancias mucilaginosas y se les separa por métodos convencionales, por ejemplo decantación, separación y/o filtración. De este modo, la PMU se puede canalizar, por ejemplo, a través de un dispositivo de separación convencional, por ejemplo un separador, una instalación de filtración o un sedimentador. Como dispositivo de separación se puede utilizar, por ejemplo, un lecho de arena o se pueden utilizar separadores convencionales, por ejemplo, separadores de tobera o de cámara. En caso deseado también puede utilizarse una instalación de microfiltración o de ultrafiltración, cuyo uso permite obtener simultáneamente la eliminación de la mayor parte de microorganismos y virus de la PMU filtrada.

En caso deseado, se pueden agregar a la orina conservantes, germicidas, bactericidas y/o antihelmínticos.

Si, en lugar de la PMU, se debe utilizar un retentado de orina más concentrado, éste se puede obtener a partir de la PMU mediante una filtración convencional por membrana. El contenido en sólidos del retentado y su composición pueden variar de acuerdo con la PMU utilizada y la membrana utilizada para la filtración, por ejemplo, su tamaño de poros, así como las condiciones de filtración. Por ejemplo, al utilizar una membrana de nanofiltración puede obtenerse una concentración del contenido en estrógenos prácticamente exento de pérdidas en el retentado de la PMU, con la separación simultánea de hasta 50% en peso de las sustancias de bajo peso molecular contenidas en la PMU. Para el procedimiento según la presente invención se pueden utilizar retentados de PMU que se han concentrado en una proporción de aproximadamente 1:10, por ejemplo una proporción de aproximadamente 1:7, y cuyo volumen, por lo tanto, puede estar disminuido hasta aproximadamente 1/10, por ejemplo aproximadamente 1/7, con respecto al volumen original de la PMU.

Las resinas adsorbentes polímeras semipolares utilizables en la etapa de procedimiento a) son polímeros orgánicos porosos no iónicos que, al contrario que las resinas adsorbentes polímeras hidrófobas no polares, tienen una polaridad intermedia (= por ejemplo, con un momento dipolar de la superficie activa de la resina en el intervalo de 1,0 hasta 3,0, particularmente 1,5 a 2,0 Debyes), y que tienen una estructura algo más hidrófila, por ejemplo, resinas de ésteres de ácidos policarboxílicos. Convenientemente, se utilizan resinas semipolares macroporosas con estructuras preferentemente macrorreticulares y con un diámetro promedio de poros de 50 a 150 y, preferentemente, 70 a 100 Angström, y una superficie específica en el intervalo de 300 a 900 y, preferentemente, de 400 a 500 m<sup>2</sup>/g. Han resultado particularmente conveniente resinas de ésteres de ácidos policarboxílicos alifáticos macroporosas, transversalmente reticuladas, en especial resinas de éster poliacrílico transversalmente reticuladas, como por ejemplo, Amberlite XAD-7<sup>®</sup> de la empresa Rohm y Haas.

La adsorción de los estrógenos conjugados sobre la resina adsorbente semipolar puede producirse de acuerdo con el documento WO 98/08526, así como de acuerdo con el procedimiento según la presente invención, por contactado de la PMU o su retentado con la resina adsorbente, introduciendo el líquido urinario en un reactor que contiene la resina adsorbente y manteniéndolo en contacto con la resina adsorbente durante un tiempo suficiente para la adsorción de su contenido de estrógenos. Una vez producida la adsorción de los estrógenos conjugados sobre la resina adsorbente, se puede separar de forma convencional la resina adsorbente cargada con la mezcla de estrógenos conjugados del resto del líquido urinario. Convenientemente, el líquido urinario se puede hacer pasar a través de una columna que contiene la resina adsorbente con una velocidad de circulación suficiente para obtener un tiempo de contacto adecuado para la adsorción del contenido en estrógenos. Son adecuadas, por ejemplo, velocidades de circulación de 3 a 10, preferentemente 5 a 7 partes por volumen de PMU/1 parte en volumen de resina adsorbente/hora. Convenientemente, la velocidad de circulación del líquido urinario a través del reactor se puede controlar trabajando con una reducida sobrepresión o depresión. La cantidad de resina adsorbente semipolar que se utiliza puede variar de acuerdo con el tipo de resina adsorbente utilizada y el contenido en sólidos del líquido urinario. Con el empleo de PMU puede cargarse, por ejemplo, una parte en volumen de resina adsorbente, por ejemplo, resina adsorbente de éster de ácido policarboxílico alifático transversalmente reticulada, con hasta 80 partes en volumen de PMU pretratada, sin que existan cantidades

## ES 2 268 125 T3

destacables de estrógenos en el líquido urinario efluente. Al utilizar un concentrado de PMU o retentato de PMU, la capacidad de carga de la resina adsorbente evidentemente se reduce en la medida en que éstos han sido concentrados. Por ejemplo, una parte en volumen de resina adsorbente de éster de ácido policarboxílico alifático transversalmente reticulado se puede cargar con una cantidad de líquido urinario correspondiente a 20 a 80, preferentemente 30 a 50 partes en volumen de PMU.

La resina adsorbente semipolar cargada con la mezcla de estrógenos conjugados se lava en la etapa de procedimiento b) con un agua de lavado ajustada a un intervalo de pH de al menos 12,0, en especial de 12,5 a 14, preferentemente de aproximadamente 12,5 a 13,5. Como agua de lavado se pueden utilizar soluciones acuosas de sustancias básicas inertes solubles en el líquido urinario, que son suficientemente fuertes para alcanzar un valor de pH de al menos 12,5. Como sustancias básicas hidrosolubles inertes con respecto a la resina adsorbente polímera semipolar resultan adecuadas, preferentemente, bases inorgánicas hidrosolubles, tales como hidróxidos de metal alcalino o alcalinotérreo, en especial hidróxido sódico. Convenientemente, el agua de lavado contiene solamente aquellas cantidades de sustancia básica necesarias para alcanzar el valor de pH deseado, preferentemente pH 13 aproximadamente. La cantidad de agua de lavado se selecciona de manera que sea suficiente para separar sustancialmente las sustancias fenólicas contenidas en la orina, sin arrastrar cantidades apreciables de estrógenos conjugados. Ha resultado conveniente, por ejemplo, el uso de 2 a 10 y, particularmente, 4 a 6 volúmenes de lecho de agua de lavado por volumen de lecho de resina adsorbente. El agua de lavado se conduce convenientemente a través del reactor que contiene la resina adsorbente con una velocidad de circulación de 3 a 10, y preferentemente 5 a 7 partes por volumen de agua de lavado por una parte en volumen de resina adsorbente/hora.

A continuación, en la etapa de procedimiento c) se trata la resina adsorbente, lavada y cargada con la mezcla de estrógenos conjugados, con una cantidad de líquido eluyente suficiente para la elución de la mezcla de estrógenos conjugados, obteniéndose un eluato que contiene la mezcla natural de estrógenos conjugados de la PMU. El eluyente utilizado según la invención es un disolvente orgánico miscible con agua, seleccionado del grupo que comprende los éteres, alcoholes inferiores y cetonas alifáticas inferiores miscibles con agua, o una mezcla de este disolvente miscible con agua y agua eventualmente alcalinizada. Como componentes etéreos del líquido de elución son adecuados éteres cíclicos miscibles con agua, tales como tetrahidrofurano o dioxano, o también éteres de cadena abierta miscibles con agua, tales como, por ejemplo, éter dimetílico de etilenglicol (= monoglime), éter dimetílico de dietilenglicol (= diglime), o etiloxi-etiloxi-etanol (= carbitol). Como alcoholes inferiores son adecuados los alcoholes alquílicos miscibles con agua de 1 a 4, preferentemente de 1 a 3 átomos de carbono, tales como etanol o isopropanol. Como cetonas alifáticas inferiores son adecuadas las cetonas miscibles con agua de 3 a 5 átomos de carbono, en especial, acetona. Han resultado particularmente convenientes los eluyentes en que el disolvente orgánico es etanol. Convenientemente, se utilizan como eluyentes mezclas de uno de los disolventes orgánicos miscibles con agua anteriormente citados y agua eventualmente alcalinizada. El valor de pH de estos eluyentes acuosos se encuentra en un intervalo desde neutro hasta alcalino hasta pH 13 y puede ser, convenientemente, de aproximadamente 10 a 12. Como componente disolvente en el eluyente acuoso se elige un disolvente estable en el intervalo de pH utilizado. Para los eluyentes alcalinos acuosos con valores de pH de aproximadamente 10 a 12 resulta conveniente como componente disolvente un alcohol inferior, preferentemente etanol. El valor de pH deseado del eluyente acuoso se obtiene por adición de una cantidad correspondiente de una sustancia básica inerte hidrosoluble, preferentemente una base inorgánica, por ejemplo un hidróxido de metal alcalino o alcalino-térreo, particularmente hidróxido sódico. En los líquidos eluyentes acuosos puede existir una relación volumétrica de disolvente orgánico miscible con agua con respecto al agua en el intervalo de 40:60 hasta 20:80, preferentemente de aproximadamente 30:70. La cantidad de eluyente utilizado puede ser de aproximadamente 3 a 10 y, en especial, de aproximadamente 4 a 6 volúmenes de lecho por volumen de lecho de resina adsorbente. Convenientemente, el eluyente se hace pasar a través de un reactor que contiene la resina adsorbente cargada con la mezcla de estrógenos, con una velocidad de circulación adecuada para que el tiempo de contacto sea suficiente para la elución completa de la mezcla de estrógenos conjugados. Al utilizar una mezcla de etanol con agua en una relación volumétrica de 30:70 son convenientes, por ejemplo, velocidades de circulación de 3 a 10, preferentemente de 5 a 7 partes en volumen de eluyente por parte en volumen de resina adsorbente y por hora. Convenientemente, la elución se lleva a cabo en un intervalo de temperatura desde temperatura ambiente hasta aproximadamente 60°C, preferentemente a aproximadamente 40 hasta 50°C. En caso deseado, la velocidad de circulación se regula trabajando a presión ligeramente incrementada, por ejemplo con una sobrepresión hasta 0,2 bar, y recogiendo el eluato en varias fracciones. Los contenidos en estrógenos conjugados y componentes fenólicos de la orina, tales como cresoles y HPMF, en las fracciones de eluato individuales se pueden determinar de forma convencional mediante cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (abreviada como "HPLC").

Durante la elución se obtiene, en primer lugar, una fracción previa incolora hasta débilmente coloreada, prácticamente exenta de estrógenos, cuya cantidad corresponde generalmente a aproximadamente un volumen de lecho. La cantidad principal de estrógenos conjugados, por ejemplo entre 80 y 99% de los estrógenos conjugados existentes en la PMU de partida, se encuentra en las fracciones principales de eluato siguientes, con una coloración que va desde amarillo oscuro hasta pardo, y cuya cantidad comprende generalmente de 2 a 4 volúmenes de lecho. Las fracciones siguientes generalmente sólo contienen trazas de estrógenos conjugados. Si se obtienen fracciones posteriores que aun muestran un contenido en estrógenos conjugados mayor que 10% en peso con relación a sustancia seca, y menor que 0,6% con relación a sustancia seca de cresoles y HPMF, éstas se pueden combinar con el eluato principal rico en estrógenos para el procesamiento siguiente.

## ES 2 268 125 T3

### Ejemplo 1

(Ejemplo comparativo)

#### 5 a) Adsorción del contenido en estrógenos de la PMU sobre una resina adsorbente semipolar de éster poliacrílico

Una columna de 220 mm de altura y de 40 mm de diámetro se carga con 300 ml de una resina adsorbente de éster poliacrílico semipolar hinchada en agua (= Amberlite XAD-7 de la empresa Rohm y Haas, granulometría 0,3 a 1,2 mm, momento dipolar 1,8 Debye, diámetro promedio de poros 80 Angström, superficie específica de aproximadamente 450 m<sup>2</sup>/g en seco). A continuación, se hacen pasar a través de la columna, a temperatura ambiente, 10,5 l (= 35 volúmenes de lecho) de una PMU filtrada a través de una instalación de ultrafiltración (contenidos en sal sulfato de estrona y cresol determinados por HPLC, véase la tabla siguiente) con una velocidad de circulación media de 24 ml/min (= 4,8 volúmenes de lecho por hora). El contenido de estrógenos de la PMU queda totalmente adsorbido sobre la columna de resina adsorbente semipolar cargada de esta forma. El líquido urinario efluente se analiza por HPLC para verificar su contenido en estrógenos conjugados (calculados como sal sulfato de estrona), y demuestra estar prácticamente exento de estrógenos. El efluente se desecha.

#### b) Lavado de la columna de resina adsorbente cargada

La columna de resina adsorbente cargada se lava con 1,5 litros de una solución acuosa de hidróxido sódico con un valor de pH de 13. A tal efecto, el agua de lavado alcalina se hace pasar a través de la columna con una velocidad de circulación media de 24,6 ml/min (= 4,9 volúmenes de lecho por hora). El líquido de lavado efluente se analiza por HPLC para verificar el contenido en sal sulfato de estrona y cresol. El análisis demuestra que durante la fase de lavado se elimina menos de 5% de la cantidad total de estrógenos cargados en la columna.

#### 25 c) Desorción de los estrógenos conjugados de la columna de resina adsorbente lavada

1,5 litros del líquido eluyente (etanol/agua 30:70) se hacen pasar a través de la columna precalentada a la temperatura de elución indicada en la tabla, con un caudal de 25 ml/min (= 5,0 volumen de lecho por hora). El eluato efluente se recoge en cinco fracciones. Cada fracción fue de 300 ml (= 1 volumen de lecho), y se analizan mediante HPLC para determinar el contenido en sal sulfato de estrona y cresol.

La primera fracción contiene solamente trazas de sal sulfato de estrógeno. El eluato es incoloro hasta levemente amarillo. En las fracciones siguientes 2 a 4 está contenida aproximadamente 80 a 98% de la cantidad total de estrógenos conjugados adsorbidos en la columna. Los eluatos tienen, en este caso, un color pardo oscuro intenso. La última fracción contiene solamente pequeñas cantidades de sal sulfato de estrógeno lo cual también puede apreciarse claramente por la disminución de la intensidad colorimétrica.

Para las fracciones que contienen la cantidad principal de estrógenos conjugados están indicados en la tabla siguiente el contenido en sustancia seca (TS) en % en peso y los contenidos en sal sulfato de estrona y cresol, determinados por HPLC. Estas fracciones son adecuadas como extractos para un procesamiento galénico posterior.

#### d) Regeneración de la columna de resina adsorbente

Para la regeneración, la columna se lava, en primer lugar, con 600 ml de una mezcla de etanol y agua con un pH 12, que contiene 50% de etanol y, luego, con 600 ml de una mezcla de agua/etanol, ajustada a pH 12, que contiene 70% en etanol y finalmente con 600 ml de una solución acuosa al 10% de citrato de sodio y, por último, con 600 ml de agua destilada. Toda la regeneración se lleva a cabo a una temperatura de 45°C. La columna se puede regenerar, cargar y regenerar nuevamente múltiples veces, por ejemplo, hasta 40 veces.

### 50 Ejemplo 2

(Procedimiento según la invención)

55 El Ejemplo 1 se repite con el lavado intermedio según la presente invención entre las etapas de procedimiento b) y c).

#### *Lavado intermedio*

60 La columna de resina adsorbente cargada se lava con 900 ml de agua. A tal efecto, el agua de lavado neutra se hace pasar a través de la columna con una velocidad de circulación media de 25,0 ml/min (= 5,0 volumen de lecho por hora).

65 El líquido de lavado efluente se analiza mediante HPLC para determinar el contenido en sal sulfato de estrona y cresol. El análisis demuestra que durante esta fase de lavado solamente se pierde una pequeña cantidad (como máximo, sólo algunos porcentajes) de la cantidad total de estrógenos cargados en la columna. De acuerdo con la invención, al llevar a cabo el procedimiento según esta invención se reduce también la proporción de estrógenos libres (véase el Ejemplo 4).

ES 2 268 125 T3

TABLA I

Resultado del Ejemplo Comparativo 1 y del Ejemplo 2 según la invención

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Ejemplo N°	1	2
<b>Etapa de procedimiento a):</b>		
PMU de partida		
Estrona mg/l	86,4	92,3
Equilina mg/l	57,0	57,0
Cresol mg/l	1191,1	877,6
<b>Etapa de procedimiento b):</b>		
Agua de lavado = Solución acuosa de NaOH	pH 13	pH 13
<b>Lavado intermedio:</b>		
Agua de lavado = agua		
Fracción de lavado 1:		
Estrona mg/l		0,0
Equilina mg/l		20,9
Cresol mg/l		18,0
Fracción de lavado 2:		
Estrona mg/l	Comparación:	125,0
Equilina mg/l	Sin lavado	0,0
Cresol mg/l	intermedio	0,0
Fracción de lavado 3:		
Estrona mg/l		290,6
Equilina mg/l		138,0
Cresol mg/l		31,5

ES 2 268 125 T3

Etapa de procedimiento c)			
5	Líquido eluyente	Etanol/agua 30 : 70	Etanol/agua 30 : 70
	Temperatura de elución	45°C	45°C
10	Fracción de eluato 1:		
	Sustancia seca (TS) % en peso	4,3	0,2
15	Estrona mg/l (TS % en peso)	0,0 (0,00)	342,7 (17,14)
	Equilina mg/l (TS % en peso)	24,8 (0,06)	182,6 (9,13)
20	Fracción de eluato 2:		
	TS % en peso	1,9	0,9
25	Estrona mg/l (TS % en peso)	2788,6 (14,68)	2053,5 (22,81)
	Equilina mg/l (TS % en peso)	1528,0 (8,04)	1120,1 (12,45)
30	Fracción de eluato 3:		
	TS % en peso	0,2	0,2
35	Estrona mg/l (TS % en peso)	193,2 (9,66)	38,9 (1,95)
	Equilina mg/l (TS % en peso)	99,8 (4,99)	19,8 (0,99)
40	Fracción de eluato 4:		
	TS % en peso	0,1	0,1
45	Estrona mg/l (TS % en peso)	7,1 (0,71)	0,0 (0,00)
	Equilina mg/l (TS % en peso)	9,3 (0,93)	0,0 (0,00)
50			
55			

60 Ejemplo 3

(Procedimiento según la invención con refrigeración)

65 *Reducción de la pérdida de hormonas durante el lavado neutro*

Se trabaja como en los ejemplos 1 y 2, pero con refrigeración. La refrigeración se lleva a cabo para minimizar las pérdidas de hormonas durante el lavado intermedio. Si el lavado intermedio se realiza con agua helada en lugar de

## ES 2 268 125 T3

agua a temperatura ambiente, la pérdida de hormonas se puede reducir en hasta aproximadamente 50%, en especial si en el procedimiento la temperatura efectivamente es de 0°C, o próxima a 0°C. Es conveniente no solamente agregar agua helada que, debido a la presencia del contenido de la columna a temperatura ambiente, puede calentarse de forma relativamente rápida, sino que es preferible refrigerar toda la columna a 0°C.

5

### *Realización del experimento*

La temperatura de 0°C de la columna necesaria para el lavado intermedio se alcanza mediante la refrigeración durante el lavado básico precedente, es decir, el lavado básico precedente ya se lleva a cabo a 0°C. La carga de hasta 10 5 volúmenes de lecho a 0°C durante el lavado básico ya ha sido suficiente para disminuir el contenido de la columna desde la temperatura ambiente a 0°C. El lavado intermedio subsiguiente puede llevarse a cabo entonces a 0°C. Además de la reducción al mínimo de las pérdidas de hormonas, también se analizó la posible influencia de la temperatura sobre la separación de cresol durante el lavado básico.

15 Para la comparación directa se llevaron a cabo dos ensayos.

#### Ejemplo 3a

Lavado básico y lavado intermedio a temperatura ambiente.

20

#### Ejemplo 3b

Lavado básico y lavado intermedio a 0°C.

25 Todas las restantes etapas se llevaron a cabo como en el procedimiento normal como se indica más arriba para el procedimiento descrito en el documento WO 98/08526 o en los Ejemplos 1 y 2.

### *Resultados de los ensayos*

30 La Tabla III indica los parámetros de los ensayos y los resultados de los mismos a temperatura ambiente y con refrigeración a 0°C.

Los resultados de los ensayos permiten apreciar claramente que:

- 35 a) el lavado básico, es decir la separación de cresol, no se ve afectado al disminuir la temperatura a 0°C. La separación de cresol se produce en forma cuantitativa. Esto está indicado en la Tabla III.
- 40 b) la pérdida de hormonas durante el lavado intermedio se reduce en aproximadamente 50% por la disminución de temperatura. Esto está indicado en la Tabla II.

TABLA II

*Pérdida de hormonas y su minimización por el lavado intermedio a 0°C*

45

<b>Ejemplo N°</b>	<b>3a</b>	<b>3b</b>
	<b>Temperatura ambiente (T = aprox. 25 °C)</b>	<b>Agua helada (T = aprox. 0 °C)</b>
<b>Estrona</b>	2,7 % en peso	1,8 % en peso
<b>Equilina</b>	3,4 % en peso	1,4 % en peso

55

La aplicación de solución de hidróxido sódico refrigerada a aproximadamente 0°C durante el lavado básico ofrece, de esta forma, una posibilidad sencilla de disminuir también la pérdida de hormonas en el lavado intermedio, 60 trabajando aproximadamente a 0°C, sin afectar a la separación de cresol.

La disminución de temperatura durante el lavado intermedio a aproximadamente 0°C permite una minimización, es decir, la disminución de las pérdidas inevitables de hormonas por el lavado intermedio adicional, en hasta aproximadamente 50%.

65

La refrigeración de la columna durante el lavado intermedio puede lograrse en forma sencilla si el lavado básico que se lleva a cabo antes del lavado intermedio también se realiza a aproximadamente 0°C. La separación de cresol que tiene lugar durante el lavado básico no resulta afectada negativamente por la disminución de temperatura.

ES 2 268 125 T3

TABLA III

*Realización del procedimiento según la invención a temperatura ambiente y con refrigeración*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

<b>Ejemplo N°</b>	<b>3a</b>	<b>3b</b>
	<b>Temperatura ambiente (T = aprox. 25 °C)</b>	<b>Agua helada (T = aprox. 0°C)</b>
<b>Etapa de procedimiento a):</b>		
<b>PMU de partida</b>		
Estrona mg/l	64,9	65,4
Equilina mg/l	57,9	57,6
Cresol mg/l	329,0	333,0
<b>Etapa de procedimiento b):</b>		
Agua de lavado = Solución acuosa de NaOH	pH 13	pH 13
<b>Fracción de lavado 1:</b>		
Estrona mg/l	4,4	1,7
Equilina mg/l	0,0	1,6
Cresol mg/l	55,1	51,6
<b>Fracción de lavado 2:</b>		
Estrona mg/l	28,8	27,9
Equilina mg/l	31,5	24,8
Cresol mg/l	6942,5	7011,0
<b>Fracción de lavado 3:</b>		
Estrona mg/l	0,0	0,0
Equilina mg/l	11,5	18,3
Cresol mg/l	2215,2	2774,0
<b>Fracción de lavado 4:</b>		
Estrona mg/l	0,0	0,6
Equilina mg/l	0,0	3,2
Cresol mg/l	280,6	268,6

ES 2 268 125 T3

5	<b>Fracción de lavado 5:</b>			
	Estrona	mg/l	0,0	0,0
	Equilina	mg/l	0,0	0,0
	Cresol	mg/l	76,6	44,1
10				
15	<b>Pérdida de hormona en las fracciones de lavado 1 - 5</b>			
	Estrona		1,5 %	1,3 %
20		Equilina	2,1 %	2,4 %

25	<b>Lavado intermedio</b>			
	Agua de lavado = agua			
30	<b>Fracción de lavado 1:</b>			
	Estrona	mg/l	0,0	0,0
	Equilina	mg/l	0,0	0,0
35		Cresol	22,8	19,4
	<b>Fracción de lavado 2:</b>			
40		Estrona	13,3	8,2
		Equilina	9,7	5,9
		Cresol	33,2	11,8
45	<b>Fracción de lavado 3:</b>			
		Estrona	48,0	32,0
		Equilina	58,3	23,3
50		Cresol	76,0	0,0
55	<b>Pérdida de hormonas en las fracciones de lavado de 1 - 3</b>			
	Estrona		2,7 %	1,8 %
60		Equilina	3,4 %	1,4 %

65

ES 2 268 125 T3

5	<b>Etapas de procedimiento c)</b>			
	Líquido eluyente		Etanol/agua 30 : 70	Etanol/agua 30 : 70
10	Temperatura de elución		45°C	45°C
	Fracción de eluato 1:			
	Sustancia seca (TS)	% en peso	0,2	0,2
15	Estrona	mg/l (TS % en peso)	76,0 (3,80)	58,0 (2,90)
	Equilina	mg/l (TS % en peso)	65,8 (3,29)	48,2 (2,41)
20				
	Fracción de eluato 2:			
25	TS	% en peso	1,0	0,9
	Estrona	mg/l (TS % en peso)	1237,0 (12,37)	1145,6 (12,73)
30	Equilina	mg/l (TS % en peso)	1093,8 (10,94)	1135,0 (12,61)
35	Fracción de eluato 3:			
	TS	% en peso	0,4	0,5
40	Estrona	mg/l (TS % en peso)	607,8 (15,20)	840,0 (16,80)
	Equilina	mg/l (TS % en peso)	524,7 (13,12)	748,4 (14,97)
45				
	Fracción de eluato 4:			
50	TS	% en peso	0,1	0,1
	Estrona	mg/l (TS % en peso)	84,6 (8,46)	144,6 (14,46)
55	Equilina	mg/l (TS % en peso)	58,2 (5,82)	107,4 (10,74)
	Cresol	mg/l (TS % en peso)	0,0 (0,00)	0,0 (0,00)
60				
65				

ES 2 268 125 T3

Fracción de eluato 5:			
TS	% en peso	0,1	0,1
Estrona	mg/l (TS % en peso)	21,1 (2,11)	34,3 (3,43)
Equilina	mg/l (TS % en peso)	7,5 (0,75)	17,9 (1,79)
Fracción de eluato 6:			
Estrona	mg/l	9,0	15,2
Equilina	mg/l	0,0	3,4

Ejemplo 4

*Disminución del contenido en hormonas libres*

En los procedimientos de los Ejemplos 1 a 3 precedentes se analizó la manera en que disminuye el contenido en hormonas libres al utilizar el procedimiento según la invención. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla IV a (ensayos comparativos sin lavado intermedio) y IV b (ensayos según la invención con lavado intermedio).

Tabla IV

*Minimización de hormonas libres*

TABLA IV a

*Ensayo comparativo sin lavado intermedio*

	Contenido en estrógenos libres en el concentrado	Contenido total en estrógenos conjugados con respecto al contenido en sustancia seca en el concentrado
	% en peso	% en peso
<b>Ensayo 1</b>	3,21	3,2
<b>Ensayo 2</b>	3,67	4,4
<b>Ensayo 3</b>	2,38	9,2
<b>Ensayo 4</b>	4,14	12,2
<b>Ensayo 5</b>	4,03	9,9

# ES 2 268 125 T3

TABLA IV b

*Ensayos con lavado intermedio (según la invención)*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

	<b>Contenido en estrógenos libres en el concentrado</b>	<b>Contenido total en estrógenos conjugados con respecto al contenido en sustancia seca en el concentrado</b>
	<b>% en peso</b>	<b>% en peso</b>
<b>Ensayo 6</b>	0,0	25,2
<b>Ensayo 7</b>	0,77	17,2
<b>Ensayo 8</b>	0,35	23,9
<b>Ensayo 9</b>	0,20	29,3
<b>Ensayo 10</b>	0,0	27,7

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la obtención de una mezcla natural de estrógenos conjugados, empobrecida en componentes fenólicos de la orina, a partir de la orina de yeguas preñadas, en el cual

10 a) un líquido urinario, constituido eventualmente por un líquido urinario exento de sustancias mucilaginosas y sólidos, un concentrado de este líquido urinario, o un retentato de orina concentrado por filtración de este líquido urinario por membrana, se pone en contacto con una cantidad de resina adsorbente polímera suficiente para la adsorción de la mezcla de estrógenos conjugados contenida en el líquido urinario, y se separa del líquido urinario remanente la resina adsorbente polímera cargada con la mezcla de estrógenos conjugados,

15 b) la resina adsorbente polímera cargada con la mezcla de estrógenos conjugados se lava con agua de lavado ajustada a un intervalo de pH de al menos 12,0, y

20 c) la resina adsorbente lavada se pone en contacto con una cantidad de líquido eluyente suficiente para la desorción de la mezcla de estrógenos conjugados adsorbida, estando constituido el líquido eluyente por un disolvente orgánico miscible con agua, seleccionado del grupo que comprende éteres, alcanoles inferiores y cetonas alifáticas inferiores miscibles con agua, o una mezcla del disolvente orgánico miscible con agua, con agua eventualmente alcalinizada, separándose de la resina adsorbente un eluato que contiene la mezcla natural de estrógenos conjugados, que eventualmente se concentra,

25 **caracterizado** porque entre las etapas de procedimiento b) y c) se lleva a cabo un lavado intermedio, durante el cual la resina adsorbente polímera cargada con la mezcla de estrógenos conjugados se lava con agua.

30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el lavado intermedio se lleva a cabo a temperaturas menores que la temperatura ambiente, en especial a temperaturas entre 0°C y 10°C, preferentemente a temperaturas mayores próximas a 0°C.

35 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el agua de lavado utilizada para el lavado intermedio está pre-refrigerada a temperaturas menores que la temperatura ambiente, en especial a temperaturas entre 0°C y 10°C, preferentemente a temperaturas mayores próximas a 0°C.

40 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el agua de lavado alcalinizada utilizada en la etapa de procedimiento b) se enfría a temperaturas menores que la temperatura ambiente, en especial a temperaturas entre 0°C y 10°C, preferentemente a temperaturas mayores próximas a 0°C.

45 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el lavado intermedio y la etapa de procedimiento b) precedente se llevan a cabo a temperaturas menores que la temperatura ambiente, en especial a temperaturas entre 0°C y 10°C, preferentemente a temperaturas mayores próximas a 0°C.

50 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los dispositivos utilizados, incluidos los reactores para la recepción de la resina adsorbente polímera y/o los reactores que ya la contienen, y/o la PMU utilizada, se usan de forma preenfriada a temperaturas menores que la temperatura ambiente, en especial a temperaturas entre 0°C y 10°C, preferentemente a temperaturas mayores próximas a 0°C.

55 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque como resinas adsorbentes polímeras se utilizan resinas adsorbentes semipolares, preferentemente resinas adsorbentes semipolares no iónicas.

60

65

70

75