

|                                                   |                                             |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO          |                                             |
| RAD: 10-116255- -5                                | FECHA: 2012-11-09 13:55:50                  |
| DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES          | EVE: 379 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II |
| TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II | FOLIOS: 8                                   |
| ACT: 519 PRESENTACION                             |                                             |

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020  
Bogotá, D.C.,  
  
Abogado(a)/Señor(a)  
MAGDA SALZBURG  
GOMEZYDIAZ@ETB.NET.CO

Asunto:      Radicación:      10-116255- -5  
                 Trámite:            11  
                 Evento:            379  
                 Actuación:           519  
                 Oficio:                    21415  
                 Folios:                    8

|                                     |                   |            |  |                               |   |
|-------------------------------------|-------------------|------------|--|-------------------------------|---|
| Patente de Invención                | X                 |            |  | Patente de Modelo de Utilidad |   |
| Vía Nacional                        |                   |            |  |                               |   |
| Vía PCT (Fase Nacional)             | X                 | Capítulo I |  | Capítulo II                   | X |
| No. Solicitud Internacional         | PCT/EP2009/052038 |            |  |                               |   |
| Fecha de Presentación Internacional | 20/02/2009        |            |  |                               |   |

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

|                   |                |                    |
|-------------------|----------------|--------------------|
| Descripción:      | Folios 6 a 45  | 20/Septiembre/2010 |
| Reivindicaciones: | Folios 46 a 49 | 20/Septiembre/2010 |
| Dibujos:          | Folios 51 a 54 | 20/Septiembre/2010 |
| Prioridad:        | BA2008A000008  | 22/Febrero/2008    |

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada.

Dado que en la presente solicitud se evidencia pago de tasa por reivindicación adicional se procede a estudiar las 19 reivindicaciones del capítulo reivindicatorio.

Título de la solicitud: “Composiciones que comprenden fitoestrógenos selectivos para receptor beta de estrógenos y fibras dietéticas”.

El problema planteado en esta solicitud consiste en proporcionar composiciones que comprenden uno o más fitoestrógenos en asociación con fibras dietéticas, insolubles y resistentes a digestión enzimática, y al uso de éstas composiciones para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la mucosa intestinal y en particular de adenopoliposis coli, y de su progreso a carcinoma colorrectal.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una composición para administración oral que comprende una asociación de al menos un fitoestrógeno, selectivamente aginista al receptor-beta de estrógenos y fibras dietéticas insolubles.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A 61 K 31/357, 31/352, 31/05, 31/716; A 61 P 1/00.

#### **4. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)**

El uso de la Reivindicación 19 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

#### **5. De la solicitud de patente**

##### **Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)**

La Reivindicación 1 no es clara cuando menciona “al menos un fitoestrógeno o una mezcla de fitoestrógenos”, “una fibra insoluble e indigerible” y “polisacáridos sin almidón” ya que tales expresiones son muy generales y no definen las características técnicas esenciales de la invención, además el término “al menos” es ambiguo e impreciso también. Se sugiere modificar la materia reclamada en la composición señalando particularmente los componentes de la composición y las cantidades exactas de los mismos que la diferencian del arte previo.

#### **6. Determinación del Estado de la Técnica**

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: Febrero 22 de 2008, y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

| Ítem | Documento      | Título                                                                                                                                                                                                                       | Fecha de Publicación* |
|------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| D1   | US2004197430   | "Nutritional supplement"                                                                                                                                                                                                     | 07/Octubre/2004       |
| D2   | DE102004054133 | "Silymarin-based food supplement for improving diet and reducing the risk of diseases of civilization, e.g. diabetes, contains a standardized flavonolignan fraction from Marian thistle and a dried Yacon root preparation" | 09/Junio/2005         |
| D3   | Artículo       | "Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis and metabolism in rats and swine"                                                                                                            | 01/Septiembre/1984    |

D1<sup>[1]</sup>: divulga un suplemento nutricional para proporcionar beneficios nutricionales tal como desintoxicación (resumen).

D2<sup>[2]</sup>: divulga un suplemento alimentario de silimarina para mejorar la calidad de la dieta y reduciendo el riesgo de enfermedades causadas por el estilo de vida (resumen).

D3<sup>[3]</sup>: divulga un estudio para la determinación el mecanismo por el cual una dieta alfalfa puede proteger contra toxicosis de zearalenona y en el metabolismo, en ratas (página 1219).

## 7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

### Novedad (Art 16 D486)

La Reivindicación 1 consiste en una composición, caracterizada porque comprende al menos un fitoestrógeno o una mezcla de fitoestrógenos selectivamente agonistas al receptor-beta de estrógenos y al menos una fibra insoluble e indigerible, o mezclas de la misma, seleccionadas del grupo que consiste de polisacáridos sin almidón para tratamiento tópico profiláctico o terapéutico de condiciones patológicas de la mucosa intestinal, seleccionadas del grupo que consiste de adenopoliposis y su progreso a adenomas avanzados y adenocarcinoma por administración oral.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

| Características esenciales | D1 | D2 |
|----------------------------|----|----|
|----------------------------|----|----|

[1]URL:[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2004197430A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20041007&DB=EPODOC&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2004197430A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20041007&DB=EPODOC&locale=en_EP)

[2]URL:[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=DE&NR=102004054133&KC=&FT=E&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=DE&NR=102004054133&KC=&FT=E&locale=en_EP)

[3] **STANGROOM K E ET AL**: "Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis and metabolism in rats and swine" CANADIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY, NRC RESEARCH PRESS, CANADA, vol. 62, no. 9, 1 September 1984 (1984-09-01), pages 1219-1224

|                                                                                                                            |                                                                                              |                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Composición oral                                                                                                           | Capsulas orales                                                                              | Composición en suplemento dietario (Reivindicación 1)              |
| un fitoestrógeno agonista al receptor-beta de estrógenos                                                                   | Silimarina 40 mg (extracto estandarizado de leche de semillas de Abrojo) (página 3, tabla 6) | Silimarina de 10-90% del extracto estandarizado (Reivindicación 1) |
| una fibra insoluble e indigerible o mezclas de la misma, seleccionadas del grupo que consiste de polisacáridos sin almidón | Inulina 200 mg (página 3, tabla 6)                                                           | Celulosa microcristalina (Reivindicación 4)                        |

De acuerdo con la tabla anterior, las características esenciales de la composición de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en los documentos D1 y D2, por lo tanto, la materia reivindicada no es nueva.

Las reivindicaciones dependientes 2 – 4 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de la Reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

**Nivel inventivo (Art18 D486)**

La reivindicación 5 consiste en la composición de la Reivindicación 1, caracterizada porque el fitoestrógeno es silimarina y la fibra insoluble es lignina.

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

| Características esenciales                  | D2                                                                 | D3                                                                    |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Composición oral                            | Composición en suplemento dietario (Reivindicación 1)              | Mezcla en la dieta alfalfa                                            |
| un fitoestrógeno que es Silimarina          | Silimarina de 10-90% del extracto estandarizado (Reivindicación 1) | No menciona                                                           |
| La fibra insoluble e indigerible es lignina | No menciona                                                        | Cumestrol + Lignina (página 1220, columna izquierda, párrafo séptimo) |

Los documentos D2 y D3 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la Reivindicación 5 porque divulgan un suplemento alimentario de silimarina para mejorar la calidad de la dieta y reduciendo el riesgo de enfermedades causadas por el estilo de vida (ver D2: resumen) y una mezcla que comprende lignina en una dieta alfalfa que puede proteger contra toxicosis de zearalenona y en el metabolismo.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 5 y la composición de D2 consiste en la fibra insoluble e indigerible que comprende, particularmente es lignina.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 5 y la mezlca de D3 consiste en el fitoestrógeno seleccionado, que particularmente es silimarina.

Esta diferencia (en la selección de la fibra insoluble lignina) no parece conceder un

efecto técnico inesperado o una ventaja a las composiciones reclamadas en esta solicitud ya que no parecen presentar propiedades superiores en comparación con las composiciones del estado de la técnica cercano.

Por lo tanto, el Problema Técnico Objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular como la necesidad de composiciones farmacéuticas que comprendan uno fitoestrógeno tipo silimarina en asociación con una fibra dietética, tipo lignina, para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de la mucosa intestinal y en particular de adenopoliposis coli, y de su progreso a carcinoma colorrectal, alternativas a las ya conocidas en el arte previo.

Sin embargo, composiciones de lignina como fibra insoluble asociada con un fitoestrógeno ya se encontraba sugerido en D3, que divulga la asociación de un fitoestrógeno como es el cumestrol con lignina (página 1220, columna izquierda, párrafo séptimo).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, habría podido adicionar particularmente la lignina de D2 en las composiciones de suplemento alimentario de silimarina que son útiles para mejorar la calidad de la dieta y reducir el riesgo de enfermedades causadas por el estilo de vida divulgadas en D3, para llegar así al objeto de la Reivindicación 5 de la presente solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Conclusión:

La Reivindicación 5 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Puesto que las reivindicaciones dependientes 6 – 18 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

## 8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

| Item | Documento           | Reivindicaciones afectadas | Requisito que afecta    |
|------|---------------------|----------------------------|-------------------------|
| D1   | US2004197430        | 1 – 4                      | Novedad                 |
| D2   | DE102004054133      | 1 – 18                     | Novedad-Nivel Inventivo |
| D3   | Stangroom k e et al | 5 – 18                     | Nivel Inventivo         |

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



**JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ**  
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2012-11-27

Elaboró: Nelson Ricardo Velasco Gonzalez  
Revisó: Gloria Jacqueline Alfonso Rozo

D3

254

1219

## Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis and metabolism in rats and swine<sup>1,2,3</sup>

K. E. STANGROOM AND T. K. SMITH<sup>1</sup>

Department of Nutrition, College of Biological Science, University of Guelph, Guelph, Ont., Canada N1G 2W1

Received January 9, 1984

STANGROOM, K. E., and T. K. SMITH. 1984. Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis and metabolism in rats and swine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62: 1219-1224.

Experiments were conducted to determine the mechanism by which dietary alfalfa can protect against zearalenone toxicosis. Female weanling rats were fed semipurified diets containing whole alfalfa meal, fractionated alfalfa meal (fiber, solvent extract, and water extract), and purified components of alfalfa (coumestrol, saponin, lignin, coumestrol + lignin, and saponin + lignin) with and without 250 mg zearalenone/kg of diet. All ingredients were provided for 2 weeks at levels corresponding to those found in diets containing 15 and 25% alfalfa. Yorkshire gilts were fed 15 and 25% alfalfa meal with and without 10 mg zearalenone/kg of diet for 4 weeks. The feeding of zearalenone to rats reduced growth and food consumption but this was overcome by 25% alfalfa. Zearalenone also increased the activity of hepatic 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD), the enzyme believed to metabolize zearalenone to  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols. Dietary alfalfa did not overcome this effect. Alfalfa fiber was the only fraction to partially overcome the growth-depressing effects of zearalenone while the other fractions had no beneficial effects and 3 $\alpha$ -HSD was not affected by diet. None of the purified components affected growth parameters or 3 $\alpha$ -HSD. The enzyme was also not affected by zearalenone or alfalfa in swine diets. Coumestrol,  $\alpha$ -zearalenone, and  $\beta$ -zearalenone were shown to be competitive inhibitors of 3 $\alpha$ -HSD in rat liver. It was concluded that the fiber fraction of alfalfa protects against zearalenone toxicity, and that this effect is not dependent on coumestrol or saponin and is not likely mediated through 3 $\alpha$ -HSD.

STANGROOM, K. E., et T. K. SMITH. 1984. Effect of whole and fractionated dietary alfalfa meal on zearalenone toxicosis and metabolism in rats and swine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62: 1219-1224.

Ces expériences visaient à déterminer par quel mécanisme l'alfafa alimentaire peut protéger de la toxicose au zéaralénone. Des rats femelles nouvellement sevrés reçurent des diètes semipurifiées contenant un repas complet de luzerne, un repas fractionné de luzerne (fibre, extrait de solvant et extrait d'eau), et des composantes purifiées de luzerne (coumestrol, saponine, lignine, coumestrol + lignine et saponine + lignine) avec et sans diète de 250 mg zéaralénone/kg. Les ingrédients furent ingérés pendant 2 semaines à des taux correspondant à ceux de diètes contenant 15 et 25% d'alfafa. Des porcs Yorkshire reçurent un repas de 15 et 25% de luzerne, avec et sans 10 mg zéaralénone/kg pendant 4 semaines. L'administration de zéaralénone aux rats réduisit la croissance et la consommation de nourriture, mais ceci fut neutralisé par 25% de luzerne. En outre, zéaralénone augmenta l'activité de 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\alpha$ -HSD), l'enzyme censé métaboliser zéaralénone en zéaralénoles  $\alpha$  et  $\beta$ . La luzerne alimentaire ne renversa pas cet effet. La fibre de luzerne fut la seule fraction capable de neutraliser les effets réducteurs de croissance de zéaralénone, alors que les autres fractions eurent pas d'effets bénéfiques et que la diète n'affecta pas le 3 $\alpha$ -HSD. Aucune des composantes purifiées n'affecta les paramètres de croissance ni le 3 $\alpha$ -HSD. L'enzyme ne fut affectée ni par le zéaralénone ni par la luzerne contenus dans les diètes des porcs. Dans le foie du rat, le coumestrol, les zéaralénoles  $\alpha$  et  $\beta$  s'avérèrent être des inhibiteurs compétitifs de 3 $\alpha$ -HSD. On a conclu que la fraction fibre de luzerne protège contre la toxicité du zéaralénone, que cet effet n'est fonction ni du coumestrol ni de la saponine et qu'il n'est vraisemblablement pas médié par le 3 $\alpha$ -HSD.

[Traduit par le Journal]

### Introduction

Zearalenone is a uterotrophic mycotoxin that can be produced when cereal grains are stored in the presence of *Fusarium roseum* under conditions of greater than 25% moisture and temperatures of 12-14°C (Caldwell and Tuile 1970). Many different species are susceptible to zearalenone toxicosis, although swine are among the most sensitive. The feeding of zearalenone at levels as low as 1-5 mg/kg diet has been shown to cause hyperestrogenism in prepubertal gilts (Mirocha and Christensen 1974). Mammary gland enlargement, tumefaction of the vulva, and vaginal and rectal prolapse are seen in immature females (Change *et al.* 1979), while immature males can suffer swelling of the prepuce and enlargement of mammary glands (Christensen *et al.* 1972). Zearalenone consumption by

mature female swine can alter reproduction resulting in increased neonatal mortality, and a decrease in fertility, lactation, and litter size (Chang *et al.* 1979).

The interrelationships between diet and zearalenone toxicosis and metabolism have been investigated in rats and swine (Smith 1980a, 1980b, 1982; James and Smith 1982). Diets containing dehydrated alfalfa meal have been shown to be among the most effective treatments for zearalenone toxicosis. James and Smith (1982) observed that the inclusion of 25% alfalfa meal in purified rat diets largely overcame growth depression, owing to zearalenone and reduced hepatic residues of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenone, a major metabolite. The feeding of alfalfa to gilts has been shown to reduce uterine enlargement caused by zearalenone (James and Smith 1982).

The mechanism by which dietary alfalfa protects against zearalenone toxicosis has not been determined. It has been proposed that alfalfa may bind zearalenone in the intestinal lumen to reduce absorption of ingested toxin and also limit reabsorption of toxin excreted in bile (Smith 1982). The adsorptive properties of alfalfa may be related to the presence of surface-active saponins as suggested by Oakenfull and Fenwick (1978). It has also been speculated that some components of

<sup>1</sup>Supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Ontario Ministry of Agriculture and Food.

<sup>2</sup>Presented in part at the 26th annual meeting of the Canadian Federation of Biological Societies, Ottawa, Ont., 1983.

<sup>3</sup>Described in part in the M.Sc. thesis presented by K. E. Stangroom to the Faculty of Graduate Studies, University of Guelph, 1983.

<sup>4</sup>Author to whom correspondence should be addressed.

103  
255

alfalfa may alter the metabolism of zearalenone by hepatic 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\alpha$ -HSD), thereby altering its toxicity (Smith 1982). The physiological activity of zearalenone may be influenced by coumestrol, a phytoestrogen present in alfalfa. Coumestrol can cause hyperestrogenism in several species if ingested at appropriately high levels (Newsome and Kitts 1980; Kincaid and Browning 1981).

The current studies were undertaken to determine which components of alfalfa meal can protect against zearalenone toxicosis. The effect of these components on the activity of 3 $\alpha$ -HSD was measured to further determine any role of this enzyme in the alleviation of zearalenone toxicosis by alfalfa.

### Materials and methods

#### Experimental animals and control diets

Female weanling Wistar rats (initial weight of 50–55 g, Woodlyn Labs Ltd., Guelph, Ont.) were used in all rat experiments. They were housed in individual stainless steel cages and fed a commercial stock diet for the first 3 days. A semipurified control diet (Table 1) with various modifications was then fed to the rats for 14 days. Feed consumption and weight gain were measured every 3 days and water was supplied *ad libitum*. At the end of the experimental period all rats were killed and various tissues were excised and stored at  $-65^{\circ}\text{C}$  for subsequent assay of 3 $\alpha$ -HSD activity.

Yorkshire gilts (8–10 kg initial weight) were used in swine experiments. Animals were housed in individual concrete pens and fed modifications of a corn-soy control diet (Table 1) for 4 weeks. All animals were then killed and tissues were excised and stored at  $-65^{\circ}\text{C}$  for subsequent assay of 3 $\alpha$ -HSD activity.

#### Rats fed alfalfa meal

A total of 60 rats were fed diets containing 0, 15, or 25% dehydrated alfalfa meal with and without 250 mg zearalenone/kg diet (10 rats/diet). Alfalfa was added to diets at the expense of corn starch, casein, and corn oil to keep all diets isocaloric and isonitrogenous (James and Smith 1982).

#### Rats fed fractionated alfalfa meal

Rats were separated into 14 groups of 10 each and fed the control diet, alfalfa fiber, alfalfa solvent extract, and alfalfa water extract. The various alfalfa fractions were fed at levels corresponding to those found in diets of 15 and 25% alfalfa meal. All diets were supplied with and without 250 mg zearalenone/kg diet and were again kept isocaloric and isonitrogenous.

#### Rats fed purified components of alfalfa meal

Six experimental diets were fed with and without 250 mg zearalenone/kg diet to a total of 120 rats (10 per diet). These included the control diet, and at levels corresponding to those found in 25% alfalfa meal diets: saponin (Pederson and Wang 1971) (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH), coumestrol (Bickoff *et al.* 1969) (Eastman Kodak Co., Rochester, NY), lignin (Smith 1980a) (Reed Paper Co., Quebec, Que.), saponin + lignin, and coumestrol + lignin. It is recognized that these purified compounds were not necessarily derived from alfalfa and may not exactly duplicate the biological activity of the same compounds found in alfalfa.

#### Swine fed alfalfa meal

Swine were fed diets containing 0, 15, or 25% alfalfa meal with and without 10 mg zearalenone/kg diet. Forty-eight swine were used, eight per diet. Alfalfa was added to the diets at the expense of corn and soybean meal to ensure that all diets were isocaloric and isonitrogenous.

#### Characterization of 3 $\alpha$ -HSD

The activity of 3 $\alpha$ -HSD was measured in liver, uterus, kidney, and leg muscle of both rats and swine. Initial characterization of 3 $\alpha$ -HSD was conducted on pooled samples of tissue obtained from two groups of 10 rats fed either the control diet or the control diet plus zearalenone. A similar procedure was used for swine. Subsequent

TABLE 1. Composition of control diets (%)

| Ingredient                         | Rats             | Swine             |
|------------------------------------|------------------|-------------------|
| Casein (vitamin free) <sup>a</sup> | 16.3             | —                 |
| Corn oil <sup>a</sup>              | 6.0              | —                 |
| Corn starch <sup>b</sup>           | 67.8             | —                 |
| Mineral mixture                    | 3.5 <sup>c</sup> | 0.1 <sup>d</sup>  |
| Vitamin mixture                    | 1.0 <sup>c</sup> | 0.25 <sup>d</sup> |
| Cellulose <sup>e</sup>             | 5.2              | —                 |
| DL-Methionine                      | 0.2              | —                 |
| Corn                               | —                | 64.05             |
| Soybean meal (49%)                 | —                | 33.0              |
| Iodized salt                       | —                | 0.5               |
| Limestone                          | —                | 0.9               |
| Dicalcium phosphate                | —                | 1.2               |

<sup>a</sup>Teklad Test Diets, Madison, WI.

<sup>b</sup>St. Lawrence Starch Co., Port Credit, Ont.

<sup>c</sup>Smith 1981.

<sup>d</sup>Smith 1984.

<sup>e</sup>Celufil, United States Biochemical Corp., Cleveland, OH.

assays were conducted on samples from individual animals. Approximately 2 g of tissue was homogenized for 30 s at  $0^{\circ}\text{C}$  in 30 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer. The homogenate was then centrifuged at  $25\,000 \times g$  for 15 min at  $0^{\circ}\text{C}$ . The supernatant, which contained both soluble and microsomal enzymes, was stored on crushed ice prior to assay. The spectrophotometric method of Koide (1969) was used to determine pH optimum, optimum substrate concentration, cofactor dependency, substrate specificity, and kinetic parameters for the enzyme.

A modification of the radioisotopic assay of Thouvenot and Morfin (1980) was employed to determine the activity of 3 $\alpha$ -HSD in rat liver in the presence of various potential inhibitors. The reaction mixture included potassium phosphate buffer (660  $\mu\text{L}$  of 0.1 M, pH 8.0), 34  $\mu\text{L}$  0.1 M NAD in buffer, 10  $\mu\text{L}$  ( $2-5 \times 10^5$  disintegration per minute) [ $1,2-^3\text{H}$ ]androsterone (New England Nuclear, Boston, MA), 10  $\mu\text{L}$  androsterone in methanol (at various concentrations), 10  $\mu\text{L}$  inhibitor in methanol, and an additional 40  $\mu\text{L}$  methanol to ensure steroid solubility. All reaction mixtures were incubated for 5 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and the reactions were then initiated by the addition of 34  $\mu\text{L}$  of supernatants. The reactions were terminated after 15 min by the addition of 5 mL ethyl acetate. The phases of the incubation mixture were allowed to separate over 12 h and the ethyl acetate layer was removed. The aqueous phase was extracted twice more with 5 mL ethyl acetate and the extracts were combined and evaporated to dryness under nitrogen. The residues were dissolved in methanol and aliquots were applied to chromatographic plates coated with silica gel G (Analaek Uniplate, Fisher Scientific Ltd., Toronto, Ont.). Plates were developed in benzene:ethyl acetate (3:1). The positions of the substrate ([ $1,2-^3\text{H}$ ]androsterone) and the product ([ $1,2-^3\text{H}$ ]androsterone) were determined by spraying the plates with anisaldehyde:  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : glacial acetic acid (1:2:100) and heating at  $100^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Identification of spots was made by comparison with known standards. Spots corresponding to the product were scraped from the plate and radioactivity was quantified by liquid scintillation spectrophotometry.

Substances tested as inhibitors included coumestrol and  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenone. The latter two compounds were purified from a racemic mixture as described by James *et al.* (1982).

#### Fractionation of alfalfa meal

Approximately 1 kg of alfalfa meal was extracted with acetone by refluxing for 72 h in a soxhlet apparatus. Acetone was separated from the solvent-extract by distillation. The residue remaining after the acetone extraction was further refluxed for 24 h with boiling water. The residue was then centrifuged at  $8000 \times g$  for 5 min and dried. This yielded the alfalfa fiber fraction. A water extract was obtained by refluxing whole alfalfa meal for 24 h with boiling water as described