

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 408**

51 Int. Cl.:

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 31/665 (2006.01)

A61K 31/585 (2006.01)

A61P 15/18 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2013** **PCT/US2013/056428**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014** **WO14031979**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2013** **E 13831276 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 2871941**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para reducir la capacidad reproductiva de las ratas hembra**

30 Prioridad:

23.08.2012 US 201261692624 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.11.2019

73 Titular/es:

SENESTECH, INC. (100.0%)
3140 North Caden Court, Suite 1
Flagstaff, AZ 86004, US

72 Inventor/es:

MAYER, LORRETTA, P. y
DYER, CHERYL, A.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 730 408 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

Composiciones y procedimientos para reducir la capacidad reproductiva de las ratas hembra

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para reducir la capacidad reproductiva de ratas hembra. Las composiciones y los procedimientos implican el uso y la administración de (a) un epóxido diterpenoide particular que comprende un esqueleto triptólido y que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras en combinación con (b) un diepóxido orgánico particular que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras.

15 Descripción de los antecedentes

Las composiciones que reducen la capacidad reproductiva de los mamíferos, particularmente aquellas que inducen el agotamiento del folículo ovárico, pueden ser deseables por una variedad de razones. Dichas composiciones pueden usarse para inducir infertilidad en plagas, tales como roedores, para controlar la población de las plagas, y para producir modelos animales para estudio. Por ejemplo, los animales, como las ratas, con el agotamiento inducido del folículo pueden usarse para crear modelos animales que pueden usarse para estudiar la menopausia y sus efectos en otros animales, como los seres humanos.

Las plagas de roedores son una de las principales causas de daños a los cultivos agrícolas y las tiendas de alimentos a nivel mundial. Los roedores comen y contaminan los suministros de alimentos, transmiten enfermedades, dañan la infraestructura y pueden alterar la vida silvestre y los ecosistemas indígenas. Durante décadas, los rodenticidas se han utilizado para tratar de controlar las poblaciones de roedores; sin embargo, hasta la fecha, las poblaciones de roedores son difíciles de controlar y el daño causado por los roedores está muy extendido. Una razón por la cual las poblaciones de roedores son difíciles de controlar es que los roedores tienden a tener períodos de gestación relativamente cortos (por ejemplo, del orden de unas pocas semanas) y, por lo tanto, a menos que se elimine toda la población, la población puede recuperarse una vez que el rodenticida se acaba o se agota. Además, los venenos no pueden atacar específicamente las plagas y pueden afectar a otros animales, incluidos los seres humanos. Por lo tanto, el uso de plaguicidas puede ser atenuado por otras cuestiones ambientales.

La tasa de reproducción de ratas está vinculada a la cantidad de alimento disponible y la calidad de las fuentes de alimento. Por lo tanto, aunque el envenenamiento reduce la población, también reduce la competencia por los alimentos, por lo que la reproducción de los sobrevivientes puede pasar sin control.

Una alternativa prometedora al uso de rodenticidas implica el uso de formulaciones que aceleran el agotamiento del folículo ovárico para controlar las poblaciones de plagas de roedores mediante el control de la fertilidad. El epóxido diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD) ha sido eficaz para causar el agotamiento del folículo primordial no regenerador en ratas Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) a través de la sonda. El documento US 2004/0073962 A1 describe un agotamiento de los folículos primordiales ováricos por VCD y sus derivados, mientras que Liu, J. et al. ("Triptolide induces adverse effect on reproductive parameters of female Sprague-Dawley rats", *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 34, No. 1, 2010, páginas 1-7) describe un número reducido de folículos en desarrollo en ratas cuando se les administra triptólido. Sin embargo, para ser efectivo en el manejo de la población, es deseable apuntar a múltiples folículos ováricos, por ejemplo, para su agotamiento, a fin de tener un impacto inmediato en la fertilidad y la producción de crías. Por consiguiente, se desean composiciones mejoradas que induzcan el agotamiento del folículo ovárico en múltiples etapas y procedimientos de uso de la composición.

50

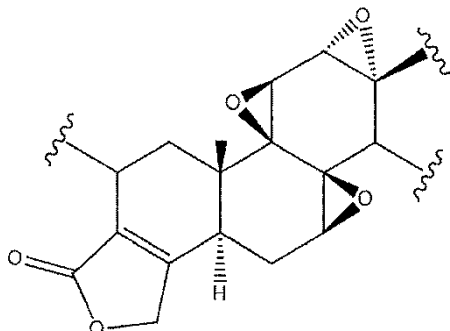
RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que pueda usarse para reducir la capacidad reproductiva de ratas hembra. En particular, las composiciones de la presente invención inducen el agotamiento del folículo ovárico cuando se administran a ratas hembra, así como a ratas macho. Otro objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos para reducir la población de ratas con las composiciones de la presente invención.

Los objetos de la presente invención se pueden lograr con una composición adecuada para agotar los folículos ováricos en ratas hembra, que comprende:

60

(a) un epóxido diterpenoide que comprende un esqueleto de triptólido representado por la siguiente estructura:

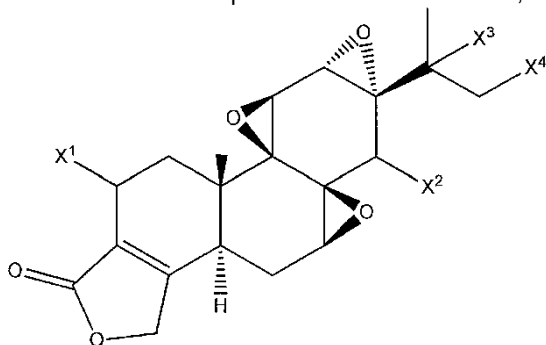


5 y que causa el agotamiento del folículo ovárico en los mamíferos hembras, y

(b) un diepóxido orgánico que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, donde este diepóxido orgánico se selecciona del grupo que consiste en diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD), glicerol diglicidil éter (GDE), 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDE), 1,4-ciclohexanodimetanol diglicidil éter (CHDE), 3,4-epoxi-ciclohexil-metil-3,4-epoxiciclohexilcarboxilato (ERL 4221) y etilenglicol diglicidil éter (quetol).

10

En una realización preferida de la invención, el epóxido diterpenoide (a) está representado por la fórmula:



donde

15

X^1 es H, R^1 , OH u OR^1 ,
 X^2 es H, R^1 , OH, OR^1 , =O o Y,
 X^3 es H u OH,
 X^4 es H, OH u OR^1 ,

20

R^1 es un grupo alquilo C_{1-4} ,
Y es $(CR^2R^3O)_nP(O)(O-Z^+)_2$,

cada R^2 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , aril-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
cada R^3 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , aril-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
o R^2 y R^3 , junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} ,

25

en el que cualquier grupo alquilo o cicloalquilo en R^2 o R^3 puede estar opcionalmente sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alcoxi C_{1-6} y NR^aR^b ,
en el que cualquier grupo arilo en R^2 o R^3 puede estar opcionalmente sustituido con uno a cinco sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , NR^aR^b , nitro y ciano,

n es 1, 2 o 3,

30

cada Z es H,

R^a y R^b son cada uno, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
o R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo pirrolidino, piperidino, piperanino, azetidino, morfolino o tiomorfolino,
o una sal del mismo.

35

En una realización preferida de la invención, X^1 es H, CH_3 , OH u OCH_3 .

En otra realización preferida de la invención, X^2 es H, CH_3 , OH, OCH_3 u = O.

En otra realización preferida, X² es Y.

En otra realización preferida de la invención, X³ es H.

En otra realización preferida de la invención, X⁴ es H, OH u OCH₃.

En una realización preferida de la invención, (a) es triptólido, triptidólido, 16-hidroxitriptólido, triptónido o minnélido.

5 En una realización particularmente preferida, (a) es triptólido.

En una realización preferida de la invención, el diepóxido orgánico (b) comprende diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD).

En una realización preferida de la invención, (a) es triptólido y (b) es diepóxido de 4-vinilciclohexeno.

10

La presente invención también incluye un procedimiento para inducir el agotamiento del folículo ovárico en una rata hembra, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente a la rata hembra.

La presente invención también incluye un procedimiento para reducir la capacidad reproductiva de una rata hembra, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente a la rata hembra.

15

En una realización preferida de la invención, la rata hembra se esteriliza mediante la administración de la composición.

La presente invención también incluye un procedimiento para controlar el tamaño de una población de ratas, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente a la población de ratas.

20

La presente invención también incluye un procedimiento para inducir el agotamiento del folículo ovárico en una rata hembra, que comprende administrar a la rata hembra una cantidad eficaz de

25 (a) un epóxido diterpenoide que comprende un esqueleto de triptólido y que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, y

(b) un diepóxido orgánico que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, donde el epóxido diterpenoide (a) y el diepóxido orgánico (b) son como se describieron anteriormente.

30 En una realización de la invención, (a) y (b) se administran como composiciones separadas.

La presente invención también proporciona un procedimiento para reducir la capacidad reproductiva de una rata hembra, que comprende administrar a la rata hembra una cantidad eficaz de

35 (a) un epóxido diterpenoide que comprende un esqueleto de triptólido y que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, y

(b) un diepóxido orgánico que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, donde el epóxido diterpenoide (a) y el diepóxido orgánico (b) son como se describieron anteriormente.

40 La presente invención también proporciona un procedimiento para controlar el tamaño de una población de ratas, que comprende administrar a la población de ratas una cantidad eficaz de

(a) un epóxido diterpenoide que comprende un esqueleto de triptólido y que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, y

45 (b) un diepóxido orgánico que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras, donde el epóxido diterpenoide (a) y el diepóxido orgánico (b) son como se describieron anteriormente.

La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar la composición descrita anteriormente, que comprende la combinación de (a) y (b).

50

Una apreciación más completa de la invención y muchas de sus ventajas concomitantes se obtendrán fácilmente a medida que la misma se entienda mejor haciendo referencia a las siguientes Figuras junto con la descripción detallada a continuación.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las realizaciones de ejemplo de la presente invención se describirán en relación con las figuras de los dibujos adjuntos.

Las Figuras 1 y 2 ilustran ovarios de control cultivados.

60 La Figura 3 ilustra un sistema de cultivo in vitro. A. Recolección de ovario de cachorro de rata posnatal día 4B. Recorte

el exceso de tejido del ovario bajo un microscopio de disección. C. El ovario aislado se coloca en una membrana que flota en un medio.

La Figura 4 ilustra un ovario cultivado tratado con 30 µm de VCD.

La Figura 5 ilustra un ovario cultivado tratado con 30 µm de VCD y 5 nm de triptólido.

5 La Figura 6 ilustra un ovario cultivado tratado con 30 µm de VCD y 10 nm de triptólido.

La Figura 7 ilustra el consumo de alimento/cebo de ratas de estudio.

La Figura 8 ilustra el aumento de peso corporal de las ratas de estudio.

La Figura 9 ilustra los recuentos de folículos de ratas alimentadas con cebo que contiene VCD y triptólido.

La Figura 10 ilustra imágenes de ovarios de ratas de cebo que contienen VCD y triptólido.

10 La Figura 11 ilustra los pesos ováricos de ratas de estudio.

Figura 12: Ilustra los resultados de ratas hembra inmaduras que consumen cebo con VCD constante (concentración del 0,099 %) combinada con concentraciones crecientes de triptólido.

Figura 13: Ilustra los resultados de ratas hembra inmaduras que consumen cantidad ilimitada de alimento y agua durante todo el período de tratamiento.

15 Figura 14: Ilustra que el efecto en cachorros nacidos por camada era dependiente de la dosis de triptólido. El eje x denota el total de triptólido consumido mg/kg de peso corporal.

Figura 15: Ilustra los resultados de ratas hembra inmaduras que consumen cebo de control, ningún ingrediente activo y hembras tratadas que comen cebo con VCD al 0,099 % y dosis altas de triptólido durante 15 días.

Figura 16: Ilustra los resultados de un bioensayo *in vitro* del agotamiento del folículo.

20

Se apreciará que las figuras no están necesariamente dibujadas en escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos en las figuras pueden ser exageradas con respecto a otros elementos para ayudar a mejorar la comprensión de las realizaciones ilustradas de la presente invención.

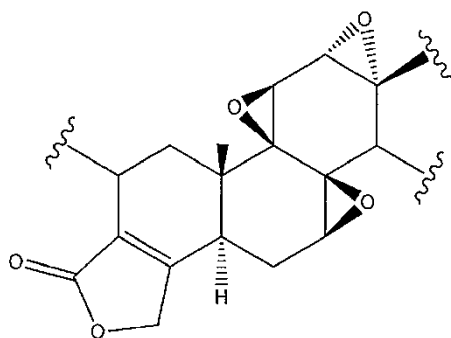
25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición adecuada para agotar los folículos ováricos en ratas hembra, que comprende:

- 30 (a) un epóxido diterpenoide particular que comprende un esqueleto de triptólido y que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras cuando se incorpora a la composición, es decir, se usa en combinación con el epóxido (b), y
(b) un diepóxido orgánico particular que causa el agotamiento del folículo ovárico en mamíferos hembras.

35 El triptólido es un epóxido diterpenoide bien conocido y muchos derivados y análogos de este compuesto también son bien conocidos y se pueden usar en la presente invención.

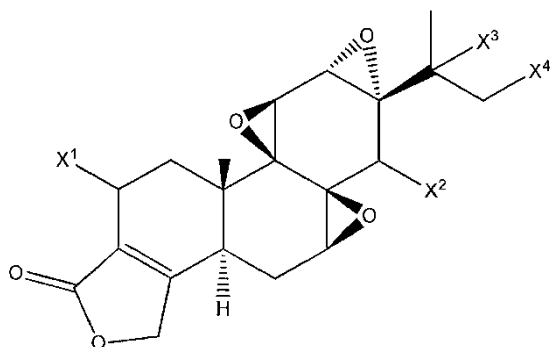
En la invención, el esqueleto de triptólido del epóxido diterpenoide (a) está representado por la siguiente estructura:



40

Por supuesto, los compuestos de la presente invención tienen una variedad de diferentes sustituyentes en el esqueleto. Los ejemplos de tales compuestos se describen a continuación.

45 En una realización preferida de la invención, el epóxido diterpenoide (a) está representado por la fórmula (I):



donde

- 5 X^1 es H, R^1 , OH u OR^1 ,
 X^2 es H, R^1 , OH, OR^1 , =O o Y,
 X^3 es H u OH,
 X^4 es H, OH u OR^1 ,
 R^1 es un grupo alquilo C_{1-4} ,
10 Y es $(CR^2R^3O)_nP(O)(O^-Z^+)_2$,
cada R^2 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , aril-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
cada R^3 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , aril-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
o R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} ,
en el que cualquier grupo alquilo o cicloalquilo en R^2 o R^3 puede estar opcionalmente sustituido con uno a cinco
15 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alcoxi C_{1-6} y NR^aR^b ,
en el que cualquier grupo arilo en R^2 o R^3 puede estar opcionalmente sustituido con uno a cinco sustituyentes
seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , NR^aR^b , nitro y ciano,
n es 1, 2 o 3,
cada Z es H,
20 R^a y R^b son cada uno, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
o R^a y R^b junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo pirrolidino, piperidino, piperanino,
azetidino, morfolino o tiomorfolino,
o una sal del mismo.
- 25 En una realización preferida de la invención, X^1 es H, CH_3 , OH u OCH_3 .
En otra realización preferida de la invención, X^2 es H, CH_3 , OH, OCH_3 u = O.
En otra realización preferida, X^2 es Y. En una realización particularmente preferida de la invención, cuando X^2 es Y,
entonces X^1 , X^3 y X^4 son H.
En otra realización preferida de la invención, X^3 es H.
30 En otra realización preferida de la invención, X^4 es H, OH u OCH_3 .
En una realización preferida de la invención, (a) es triptólido, triptidólido, 16-hidroxitriptólido, triptónido o minnélido.
En una realización particularmente preferida, (a) es triptólido.

Se proporcionan descripciones detalladas y procedimientos para preparar el compuesto (a) en una variedad de
35 referencias, tales como los documentos US 6.294.546, 7.626.044, 6.548.537, 6.004.999, 8.268.882 y WO
2010/129918. Las mezclas de diferentes compuestos dentro del alcance de (a) se incluyen en la presente invención.

El componente (b) de la composición de la invención es un diepóxido orgánico que es capaz de causar el agotamiento
del folículo ovárico en mamíferos hembras.

40 En la invención, el diepóxido orgánico comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en
diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD), glicerol diglicidil éter, 3,4-epoxi-ciclohexil-metil-3,4-epoxiciclohexil carboxilato,
1,4-ciclohexandimetanol diglicidil éter, etilenglicol diglicidil éter, resorcinol glicidil éter y 1,4-butanodiol diglicidil éter.
Las mezclas de diepóxidos están dentro del alcance de la invención.

45 Otros diepóxidos orgánicos que pueden usarse en la presente invención incluyen 1,2,3,4-diepoxibutano, 1,2,4,5-
diepoxipentano, 1,2,5,6-diepoxipentano, 1,2,6,7-diepoxipentano, 1,2,7,8-diepoxioctano, 1,2,3,4-diepoxiciclohexano,
1,2,5,6-diepoxiciclooctano, ácido 9,10,12,13-diepoxiesteárico, 3,4-epoxi-6-metil-ciclohexilmetil-3,4-epoxi-6-

metilciclohexancarboxilato, resorcinoldiglicidil éter, hexaepoxiescualeno, bis-(2,3-epoxi-2-metilpropil)éter, bis-(3,4-epoxibutil)éter, etilenglicol bis-(2,3-epoxi-2-metilpropil)éter, 2,3-epoxi-2-etilhexil-9,10-epoxiestearato, 2-etil-1,3-hexanodiol bis-(9,10-epoxiestearato), 2,3-bis(glicidiloxi)-1,4-dioxano, bis-(3,4-epoxiciclohexilmetil) adipato, bis-(3,4-epoxi-metilciclohexilmetil) adipato, 3,4-epoxi-6-metilciclohexilmetil 3-4-epoxi-6-metilciclohexancarboxilato, dióxido de limoneno y bis-(2,3-epoxiciclopentil) éter. Dichos compuestos se describen, por ejemplo, en Weil, Industrial Hygiene Journal, julio-agosto de 1963, páginas 305-325 y Van Duuren, Annals New York Academy of Sciences, 1969, páginas 633-651.

En una realización preferida de la invención, el diepóxido orgánico comprende diepóxido de 4-vinilciclohexeno. En una realización muy particularmente preferida de la invención, (a) es triptólido y (b) es diepóxido de 4-vinilciclohexeno.

La reactividad química de los epóxidos puede determinarse en un ensayo de alquilación utilizando 4-(p-nitrobenzil) piridina (NBP) basado en el procedimiento descrito en "Detection of epoxides with 4-(p-nitrobenzyl) pyridine". Agarwal et. al. 1979, Bull. Environm. Contam. Toxicol. 23, 825-829.

La actividad biológica de los epóxidos puede evaluarse en un bioensayo *in vitro* utilizando ovarios de cría de rata según el procedimiento descrito en "Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide". Devine et. al. 2002, Toxicol. Appl. Pharmacol. 184, 107-115. La actividad biológica se puede determinar por el recuento de folículos en secciones ováricas después de un cultivo de una semana con concentraciones micromolares del epóxido. En general, los epóxidos biológicamente activos también serán químicamente activos, pero no *al revés*.

La presente invención también incluye un procedimiento para inducir el agotamiento del folículo ovárico en una rata hembra, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente a la rata hembra.

La presente invención también incluye un procedimiento para reducir la capacidad reproductiva de una rata hembra, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente a la rata hembra.

Se observa que se sabe que la exposición oral a triptólido compromete la fertilidad de rata macho a la esterilidad final. Por lo tanto, tanto hombres como mujeres pueden tratarse de acuerdo con la presente invención. En una realización preferida de la invención, el mamífero se esteriliza mediante el tratamiento en la presente invención, es decir, el animal ha perdido su capacidad reproductiva.

La presente invención también incluye un procedimiento para controlar el tamaño de una población de ratas, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición descrita anteriormente a la población de ratas. En este aspecto de la invención, una serie de animales, es decir, una población, son objeto de tratamiento en un rango de área, por ejemplo, en un parque o en una reserva natural, agricultura, operaciones concentradas de alimentación animal, negocios comerciales, residenciales, tierras federales. Esta realización de la invención es particularmente útil para controlar la población de ratas en un sistema de transporte público urbano. Por ejemplo, un sistema de metro urbano. El sistema de metro de la ciudad de Nueva York, por ejemplo, es bien conocido por tener una gran población de ratas. En esta realización de la invención, la composición de la invención se proporciona para que las ratas ingieran todo el sistema. Se espera que tal tratamiento reduzca el tamaño de la población de ratas y posiblemente elimine la población.

La presente invención también incluye todos los procedimientos descritos anteriormente en los que (a) y (b) se administran por separado si se desea, es decir, (a) y (b) no se incorporan en una única composición. Además, aunque (a) y (b) se administrarán preferiblemente al mismo tiempo, también está dentro del alcance de la presente invención con respecto a esta realización que (a) y (b) pueden administrarse en diferentes momentos, con el entendimiento de que tanto (a) como (b) estarán presentes juntos para proporcionar el efecto sinérgico proporcionado por la presente invención. Preferiblemente, (a) y (b) se administran dentro de 24, 12, 6, 3, 2 o 1 horas o menos entre sí.

De acuerdo con diversas realizaciones, la composición de la presente invención está configurada para causar esterilidad en ratas hembra al inducir el agotamiento ovárico de los folículos. De acuerdo con diversos aspectos de estas realizaciones, todas las etapas de los folículos están dirigidas. Para causar la pérdida permanente de la función ovárica, el conjunto finito primordial de folículos es el objetivo. Para causar una rápida reducción en la producción de descendientes, los folículos en crecimiento están dirigidos.

El componente (b) de la presente invención (por ejemplo, VCD) se usa para dirigirse a los folículos primordiales/primarios, y el componente (a) (por ejemplo, triptólido) se usa para dirigirse a los folículos en crecimiento. La combinación se utiliza para suprimir permanentemente la reproducción en las ratas tratadas por la presente

invención. Además, se sabe que el triptólido reduce la fertilidad en los mamíferos machos, por lo que la composición reduce la fertilidad tanto en los mamíferos machos como en las hembras. La composición también se puede utilizar para acelerar la insuficiencia ovárica en mamíferos, como las mujeres perimenopáusicas.

- 5 Una dosis de un agente activo puede variar según el propósito del tratamiento y el tipo de animal. Sin embargo, de acuerdo con realizaciones de ejemplo de la descripción, la composición incluye de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 750 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de (b) y de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 5 nM a aproximadamente 1 mM, o aproximadamente 5 nM a aproximadamente 20 nM de (a). Estos intervalos incluyen
10 todos los valores específicos y subintervalos entre ellos, como 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 5 mM, 25 nM, 50 mM y 250 mM. Sorprendente e inesperadamente, se encontró que las composiciones de la presente invención agotan todas las etapas de los folículos ováricos. Se cree que el agotamiento se debe a la combinación sinérgica de (b) y (a), del que se piensa que permite el uso de concentraciones más bajas de cada uno de los agentes, en comparación con las composiciones que no incluyen la combinación, y que resulta en mayores porcentajes de
15 agotamiento de los folículos.

- Para aplicaciones de cultivo *in vitro*, la relación molar de (a) a (b) puede variar de 1/5 a 1/75.000, incluyendo todos los valores específicos y subintervalos entre ellos, como 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1.000, 1/2.500, 1/5.000, 1/10.000, 1/25.000 y 1/50.000. Para la aplicación *in vivo* (por ejemplo, un cebo), la relación molar correspondiente es
20 generalmente de 1/5 a 1/500, incluidos todos los valores específicos y subintervalos entre ellos, como 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/250.

- Para las aplicaciones de cultivo *in vitro*, la relación de peso de (a) a (b) generalmente varía de 1/2 a 1/50.000, incluyendo todos los valores específicos y subintervalos entre ellos, como 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500,
25 1/1.000, 1/2.500, 1/5.000, 1/10.000 y 1/25.000. Para la aplicación *in vivo* (por ejemplo, un cebo), la relación de peso correspondiente es generalmente de 1/5 a 1/500, incluidos todos los valores específicos y subintervalos entre ellos, como 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/250.

- Aunque se estudiaron composiciones que incluían VCD para inducir el agotamiento del folículo, se encontró que VCD
30 solo como el único ingrediente activo no causó falla ovárica prematura a bajas concentraciones, o duraciones de exposición cortas <15 días. La falla ovárica prematura ocurre cuando ya no se producen más ovulaciones a pesar de que los huevos/folículos están presentes en un ovario. Para que las composiciones y los procedimientos funcionen como un medio de control de la población, la falla ovárica se produce rápidamente, por ejemplo, dentro de los 10 días de tratamiento para roedores.

- 35 De acuerdo con diversas realizaciones, un procedimiento para inducir el agotamiento del folículo ovárico incluye las etapas de proporcionar una composición que comprende VCD y triptólido, en donde la composición induce el agotamiento de múltiples etapas de los folículos ováricos. Por ejemplo, la composición puede causar el agotamiento de los folículos primordiales, secundarios y terciarios y de los cuerpos lúteos. De acuerdo con aspectos adicionales,
40 la combinación puede causar un aumento en el agotamiento del folículo primordial y una destrucción más completa de los folículos primordiales, en comparación con las composiciones que incluyen sólo VCD.

- La composición y el procedimiento divulgados en el presente documento se pueden usar para esterilizar ratas, controlar la población de tales animales y similares alimentando la composición a poblaciones de ratas. Como se
45 señaló anteriormente, la composición reduce la fertilidad en los mamíferos machos, por lo que la administración de la composición a machos y hembras de una población se cree que reduce aún más la población, en comparación con composiciones que sólo afectan la fertilidad de machos o hembras.

- De acuerdo con realizaciones adicionales, se proporciona una hembra de rata que tiene el agotamiento del folículo
50 ovárico inducido por la administración de una composición que comprende VCD y triptólido, en donde la composición induce el agotamiento de múltiples etapas de los folículos ováricos. El animal se puede usar, por ejemplo, para estudiar la menopausia y los tratamientos posmenopáusicos, y se puede usar como un modelo animal para animales, como los seres humanos.

- 55 Los mamíferos se pueden alimentar de acuerdo con una variedad de técnicas, tales como sonda y utilizando cebo. Cuando se usa la sonda, la concentración de (b) (por ejemplo, VCD) típicamente varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/kg/día de la alimentación y la cantidad de (a) (por ejemplo, triptólido) varía de aproximadamente 25 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal de la composición. Estos intervalos incluyen todos los valores específicos y subintervalos entre ellos, incluyendo 35, 60, 75, 90, 125, 150 y 175
60 µg/kg de peso corporal.

5 Cuando se usa el cebo, de acuerdo con realizaciones de ejemplo, el cebo se formula de tal manera que: los ingredientes activos consumidos no causen efectos secundarios adversos, el cebo se produce en presencia de otras fuentes de alimentos, el cebo es ambientalmente neutro, es decir, los ingredientes activos no persisten en el ambiente y no se produce acumulación de tejido residual, lo que podría conducir a una exposición secundaria de animales no objetivo, los ingredientes activos no deben poner en riesgo a los humanos, y la producción de cebo debe ser escalable para la producción. El cebo puede ser sólido, semisólido o líquido.

10 Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden incluir los ingredientes descritos en el presente documento, así como materiales inertes adicionales y/o alternativos, conservantes y otros constituyentes encontrados típicamente en composiciones similares. En el caso de que se enumeren materiales inertes y/o conservantes de ejemplo, estos ingredientes son meramente ilustrativos, y se entiende que otros ingredientes similares pueden ser sustituidos por los materiales enumerados en los ejemplos a continuación.

15 EJEMPLOS

Habiendo descrito en general esta invención, puede obtenerse una comprensión adicional por referencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento con fines de ilustración solamente y no pretenden ser limitativos a menos que se especifique lo contrario.

20 *In vitro*

Ejemplo comparativo 1

25 Las Figuras 1 y 2 ilustran imágenes de ovarios de cachorros de rata de 4 días. Los ovarios de control ilustran abundantes folículos secundarios primordiales/primarios y en desarrollo.

Ejemplo Comparativo 2

30 La Figura 3 ilustra un sistema de cultivo *in vitro* para evaluar la eficacia de composiciones de agotamiento de folículos (desarrolladas por Patrick J. Devine). Como se indica en los diversos ejemplos de este documento, los ovarios se cultivan con VCD con o sin triptólido en medios sin suero durante 8 días, sin gonadotropinas presentes, sin cambios en los medios e ingredientes activos agregados sólo una vez al inicio del cultivo. Los ovarios se recolectan y procesan para que la histología realice el conteo de folículos.

35 La Figura 4 ilustra un ovario tratado con 30 μ m de VCD. Como se ilustra, el ovario mostró una reducción del 38 % en los folículos primordiales. Las otras etapas de los folículos no fueron afectadas significativamente por el tratamiento.

Ejemplo 3

40 La Figura 5 ilustra un ovario cultivado tratado con 30 μ m de VCD y 5 nm de triptólido utilizando el sistema y el procedimiento del ejemplo comparativo 2. El ovario no tiene folículos sanos aparentes y exhibe atresia y picnosis extensas. Como se ilustra, la aplicación *in vitro* de la composición al ovario causó el agotamiento del 100 % de todas las etapas de los folículos.

45 Ejemplo 4

La Figura 6 ilustra un ovario cultivado tratado con 30 μ m de VCD y 10 nm de triptólido. Como se ilustra, la aplicación *in vitro* de la composición al ovario causó el agotamiento del 100 % de todas las etapas de los folículos.

50 *In vivo*

Ejemplo 5

55 Los estudios *in vivo* se realizaron utilizando un ensayo de alimentación de 15 días de ratas Sprague-Dawley hembras jóvenes. La concentración de VCD se mantuvo constante a 75 mM y la concentración de triptólido se varió como se indica a continuación. El diseño del experimento fue el siguiente:

Control sin ingredientes activos (n = 6)

60 VCD + triptólido 25 μ g/kg de peso corporal (n = 7)

VCD + triptólido 50 µg/kg de peso corporal (n = 7)
VCD + triptólido 100 µg/kg de peso corporal (n = 7)

- El experimento se diseñó para evaluar: la palatabilidad y la cantidad de cebo consumido, la salud de las ratas (peso corporal registrado diariamente) y los ovarios recolectados para el análisis folicular. Las ratas tuvieron acceso a la comida estándar junto con el control o el cebo de tratamiento durante 15 días consecutivos. La Figura 7 ilustra el consumo diario promedio/peso corporal para cada grupo y la Figura 8 ilustra las tendencias de peso corporal para cada grupo.
- 10 La Figura 9 ilustra los conteos de folículos primordiales, los conteos de folículos secundarios, los conteos de folículos antrales y los conteos de cuerpos lúteos para cada uno de los grupos. En comparación con el grupo de control, el grupo tratado con triptólido 50 µg/kg de peso corporal mostró un 50 % de agotamiento en los recuentos de folículos primordiales, un 64 % de agotamiento en los recuentos de folículos secundarios, un 80 % de agotamiento en los recuentos de folículos antrales y un 100 % de agotamiento en los recuentos de cuerpos lúteos. La Figura 10 ilustra imágenes de los ovarios de cada grupo y la Figura 11 ilustra los pesos de los ovarios para cada grupo.

Eficacia *in vivo*

- Se proporcionó una composición de cebo que contenía dos ingredientes activos, diepóxido de 4-vinilciclohexeno al 0,099 % en peso y triptólido al 0,0012 % a ratas hembra Sprague Dawley inmaduras durante 15 noches sucesivas en presencia de agua ilimitada y comida para ratas de laboratorio y consumieron > 10 % de su peso corporal/noche. Al día siguiente, después del final de la dosificación, las ratas hembra se criaron durante 21 días con criadores de machos adultos no tratados y probados. Las ratas de control que consumieron una emulsión sin ingredientes activos dieron a luz camadas promedio de 12,2 crías de rata después de un promedio de 39,7 días desde el inicio de la dosificación.
- 25 Las ratas que consumieron la composición de cebo de la invención tenían un tamaño promedio de camada de 4,3 cachorros después de un promedio de 55,9 días desde el inicio de la dosificación. Sin embargo, 2 de las 8 ratas que bebieron la composición de la invención nunca entregaron una camada y otras 2 ratas entregaron una camada de 1 cachorro.
- 30 Además, en el grupo alimentado con el cebo de la invención, la rata que consumió la menor cantidad de las 8 ratas, 8 mg/kg de peso corporal versus 16 mg/kg de peso corporal para las otras 7 ratas, dio a luz a una camada de 15 animales, indicando claramente una relación de dosis inversa entre la composición consumida y el número de animales/camada. Estos resultados son consistentes con los datos presentados anteriormente, que fueron recuentos de folículos reducidos después del consumo del cebo de la invención. En ese conjunto de datos, hubo un efecto más pronunciado del cebo en el crecimiento de los folículos y cuerpos lúteos, lo que sugiere que hubo menos ovulaciones. Por lo tanto, el consumo de la composición de la presente invención por parte de ratas hembra redujo las ovulaciones ováricas en la medida en que se produce un 65 % menos de crías y las ovulaciones retrasadas prolongan significativamente el tiempo hasta el parto. La combinación de estos dos efectos en ratas que tienen vidas cortas, menos de 1 año en la naturaleza, ejerce un profundo efecto en el número total de crías de ratas nacidas por rata hembra y, en última instancia, en el tamaño de la población general.

Ejemplo 6: Aplicación *in vivo* de una composición de cebo

- Se prepararon composiciones de cebo con una concentración constante de VCD y concentraciones crecientes de triptólido.

Las ratas hembra inmaduras consumieron cebo con VCD constante (concentración del 0,099 %) combinada con concentraciones crecientes de triptólido, bajo 3,99 µg/ml, medio 7,96 µg/ml y alto 11,92 µg/ml durante 15 días. La Figura 12A es la cantidad de triptólido consumida por día de dosis baja, media o alta de grupos ± SEM. La Figura 12B es la cantidad de VCD consumida por día de los grupos de dosis de triptólido baja, media y alta ± SEM.

- Las ratas hembra inmaduras tenían una cantidad ilimitada de comida y agua durante todo el período de tratamiento. El día 0 representa la primera noche de cebo con ingredientes activos de triptólido y VCD presentados durante el período de apagado de las luces. A la mañana siguiente, se midió la cantidad de cebo consumido y se evaluó la salud general de las ratas y se pesaron. Los resultados se muestran en la Figura 13. Los datos presentados en la Figura 13 muestran que durante el tiempo en que las ratas comían el cebo, continuaron creciendo a tasas similares. Además, el estado general de las ratas era bueno y se comieron el cebo en una cantidad constante durante los 15 días completos, alrededor del 8 % al 10 % de su peso corporal.

- 60 Las ratas hembra inmaduras comieron cebo con una alta concentración de triptólido y VCD al 0,099 % durante 15

días. El día después de la última toma de cebo, las ratas hembra se criaron con ratas reproductoras machos probadas no tratadas. El número de crías por camada se contabilizó en el día posnatal 4. Los resultados se muestran en la Figura 14. Los datos presentados en la Figura 14 muestran que el efecto en crías nacidas por camada dependió de la dosis de triptólido. Existe una fuerte correlación inversa entre la cantidad de dosis de triptólido y el número de crías nacidas por camada.

Las ratas hembra inmaduras comieron cebo de control, ningún ingrediente activo, y las hembras tratadas comieron cebo con VCD al 0,099 % y una dosis alta de triptólido durante 15 días. El día después del final del cebo, las ratas hembra tratadas se criaron con ratas reproductoras machos probadas. Los días hasta el parto se contaron desde el día 0 de la cría hasta el parto. Los datos se presentan en la Figura 15, donde los símbolos son medios para cada grupo $\pm$ SEM.

Ejemplo 7: *Ensayo in vitro*

Bioensayo in vitro del agotamiento del folículo, ovarios cultivados durante 8 días con diferentes productos químicos. Control: sin productos químicos, Triptólido - 5 nM (Trip), Diepóxidos, RDE, CHDE, Quetol, ERL 4221, BDE, GDE, cada uno a 30 μ M + Trip 5 nM Los ovarios fueron preparados para el análisis histológico para la determinación del agotamiento del folículo. Producto químico comparado (reactividad en el ensayo de epóxidos) a la actividad biológica (agotamiento del folículo)

Reactividad química	Diepóxido	Actividad biológica
4	RDE	1
5	GDE	2
6	BDE	3
3	CHDE	4
2	Quetol	5
1	ERL 4221	6

Clasificación, 1 - menor reactividad química/actividad biológica, 6 - mayor reactividad química/actividad biológica

Conclusiones:

1. En un experimento previo, ninguno de estos diepóxidos analizados a 30 μ M causó un agotamiento significativo del folículo.
2. En este experimento, el triptólido (Trip) a 5 nM no causó un agotamiento significativo del folículo.
3. Sólo cuando se combinaron triptólido y GDE, BDE, CHDE, Quetol y ERL 4221 hubo un agotamiento significativo del folículo. La combinación de triptólido + RDE no causó un agotamiento significativo del folículo.
4. ERL 4221 es la mejor ilustración de la relación entre la actividad química y biológica. ERL 4221 fue el menos reactivo químicamente, mientras que fue más biológicamente activo cuando se combinó con Trip.
5. La combinación de Trip y estos diepóxidos GDE, BDE, CHDE, Quetol, ERL 4221 causó un importante agotamiento del folículo, aparentemente a través de interacciones sinérgicas.

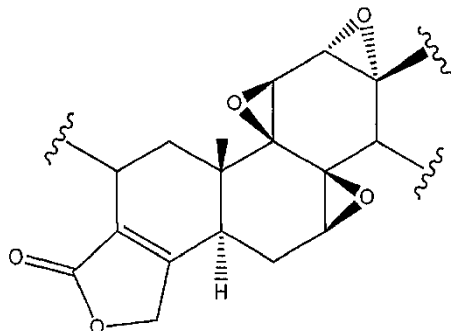
La presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a varias realizaciones ilustrativas y ejemplos. Debe apreciarse que las realizaciones particulares mostradas y descritas en este documento son ilustrativas de las realizaciones preferidas de la invención y su mejor modo, y no pretenden limitar el alcance de la invención como se establece en las reivindicaciones. Se reconocerá que pueden realizarse cambios y modificaciones en las realizaciones descritas en este documento sin apartarse del alcance de la presente invención. Estos y otros cambios o modificaciones pretenden incluirse dentro del alcance de la presente invención, tal como se expresa en las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes legales.

Obviamente, numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, se entiende que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede llevarse a cabo de otra manera que no sea la específicamente descrita en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición adecuada para reducir la capacidad reproductiva de ratas hembra, que comprende:

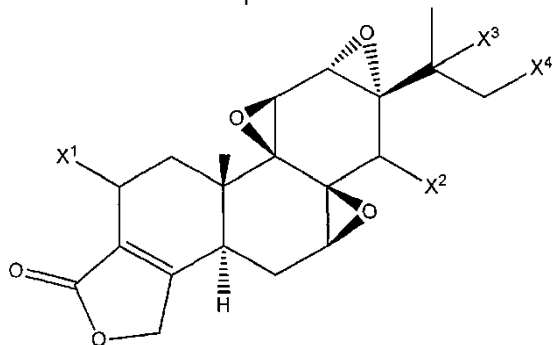
- 5 (a) un epóxido diterpenoide o una de sus sales que comprende un esqueleto de triptólido representado por la siguiente estructura:



y que causa el agotamiento del folículo ovárico en los mamíferos hembras, y

- 10 (b) un diepóxido orgánico seleccionado del grupo que consiste en diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD), glicerol diglicidil éter (GDE), 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDE), 1,4-ciclohexandimetanol diglicidil éter (CHDE), 3,4-epoxi-ciclohexil-metil-3,4-epoxyciclohexilcarboxilato (ERL 4221) y etilenglicol diglicidil éter (quetol).

2. La composición de la reivindicación 1, en la que (a) está representada por la fórmula (I):



donde

- X^1 es H, R^1 , OH u OR^1 ,
 20 X^2 es H, R^1 , OH, OR^1 , =O o Y,
 X^3 es H u OH,
 X^4 es H, OH u OR^1 ,
 R^1 es un grupo alquilo C_{1-4} ,
 Y es $(CR^2R^3O)_nP(O)(O^-Z^+)_2$,
 25 cada R^2 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , aril-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
 cada R^3 es, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , aril-alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
 o R^2 y R^3 junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo cicloalquilo C_{3-7} ,
 en el que cualquier grupo alquilo o cicloalquilo en R^2 o R^3 puede estar opcionalmente sustituido con uno a cinco
 30 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halo, alcoxi C_{1-6} y NR^aR^b ,
 en el que cualquier grupo arilo en R^2 o R^3 puede estar opcionalmente sustituido con uno a cinco sustituyentes
 seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , alcoxi C_{1-6} , NR^aR^b , nitro y ciano,
 n es 1, 2 o 3,
 cada Z es H,
 R^a y R^b son cada uno, independientemente, H, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-6} o arilo,
 35 o R^a y R^b , junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un grupo pirrolidino, piperidino, piperanino,
 azetidino, morfolino o tiomorfolino,
 o una sal del mismo.

3. La composición de la reivindicación 2, en la que X^1 es H, CH_3 , OH u OCH_3 .
4. La composición de la reivindicación 2, en la que X^2 es H, CH_3 , OH, OCH_3 u = O.
- 5 5. La composición de la reivindicación 2, en la que X^2 es Y.
6. La composición de la reivindicación 2, en la que X^3 es H.
- 10 7. La composición de la reivindicación 2, en la que X^4 es H, OH u OCH_3 .
8. La composición de la reivindicación 1, en la que el epóxido diterpenoide (a) es triptólido, triptidólido, 16-hidroxitriptólido, triptónido o minnélido o una sal de las mismas.
- 15 9. La composición de la reivindicación 1, en la que el epóxido diterpenoide (a) es triptólido.
10. La composición de la reivindicación 1, en la que el diepóxido orgánico (b) es diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD).
- 20 11. La composición de la reivindicación 1, en la que el epóxido diterpenoide (a) es triptólido y el diepóxido orgánico (b) es diepóxido de 4-vinilciclohexeno (VCD).
12. La composición de la reivindicación 1, en la que la concentración del epóxido diterpenoide (a) en la composición es de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 mM y la concentración del diepóxido orgánico (b) en la composición es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 750 mM.
- 25 13. La composición de la reivindicación 1, en la que la relación molar del epóxido diterpenoide (a) al diepóxido orgánico (b) es de 1/5 a 1/75.000.
- 30 14. La composición de la reivindicación 1, en la que la relación molar del epóxido diterpenoide (a) al diepóxido orgánico (b) es de 1/2 a 1/50.000.
15. La composición de la reivindicación 1, en la que la relación molar del epóxido diterpenoide (a) al diepóxido orgánico (b) es de 1/5 a 1/500.
- 35 16. Un procedimiento para reducir la capacidad reproductiva de ratas hembra de una población de ratas que comprenden ratas macho y hembras, que comprende alimentar a la población de ratas con una cantidad eficaz de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 8 a 15, en el que la composición es consumida por las ratas macho y hembras, y
- 40 la composición reduce la capacidad reproductiva de las ratas hembra.

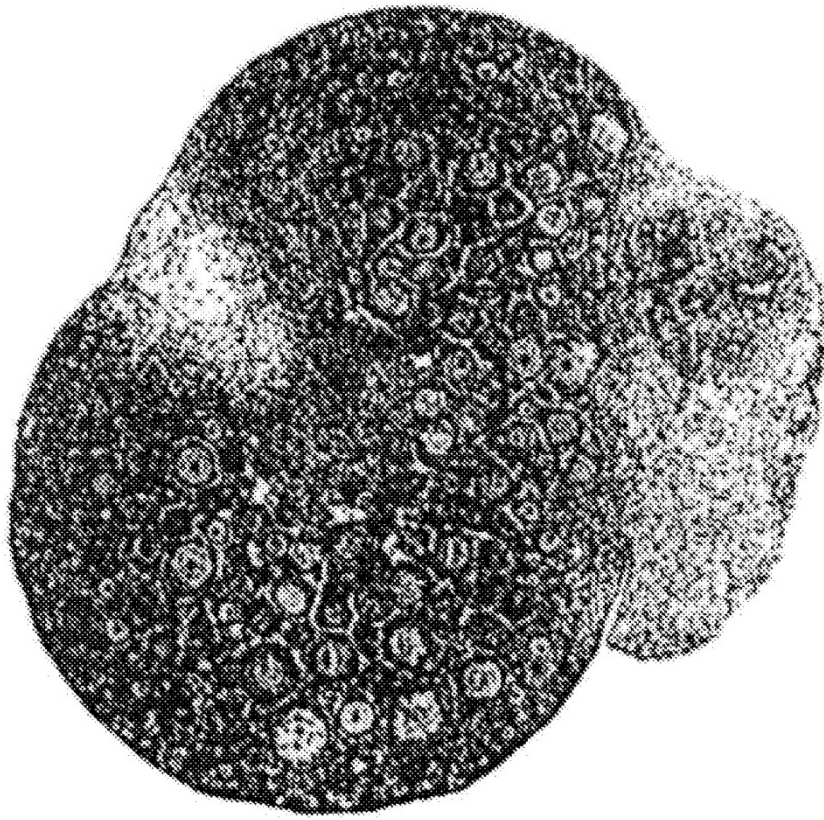


FIG.1

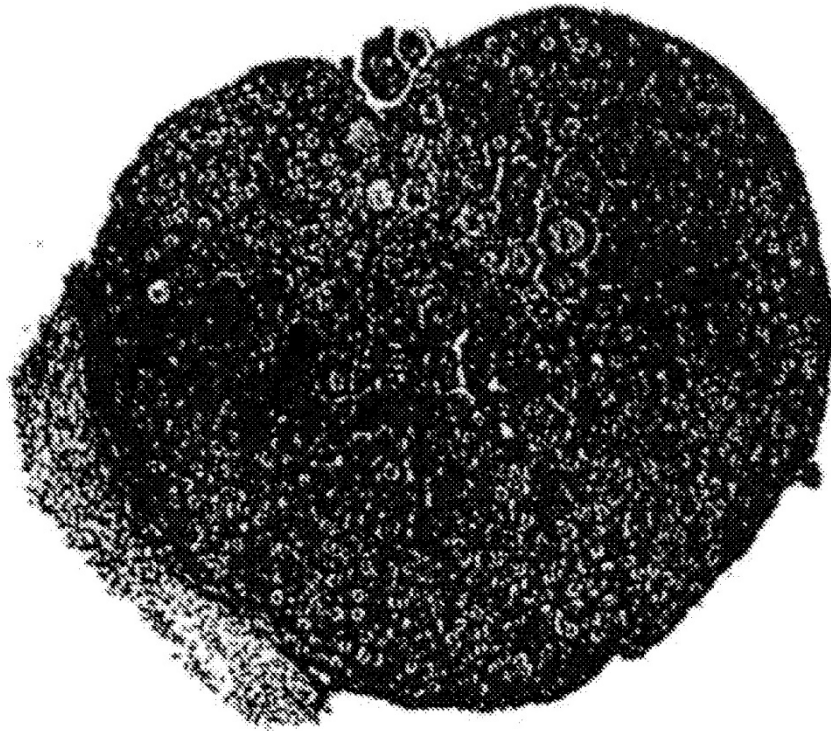


FIG.2

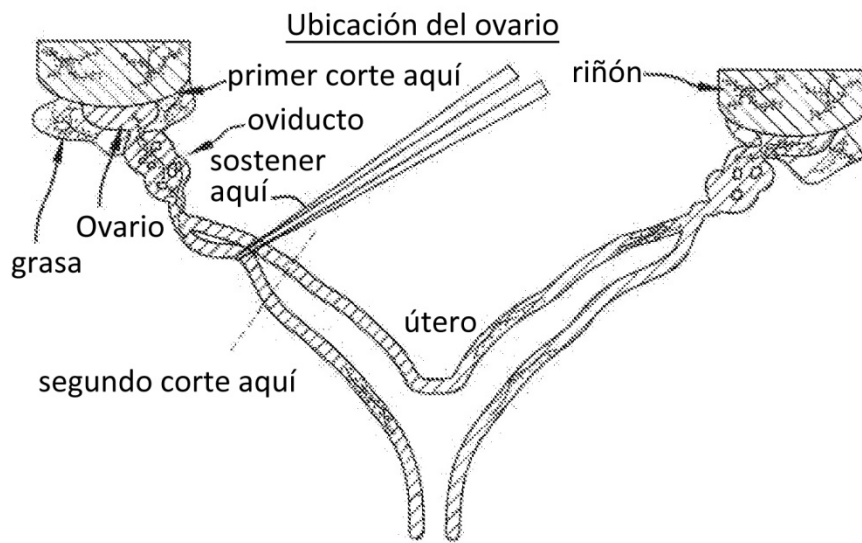


FIG.3A

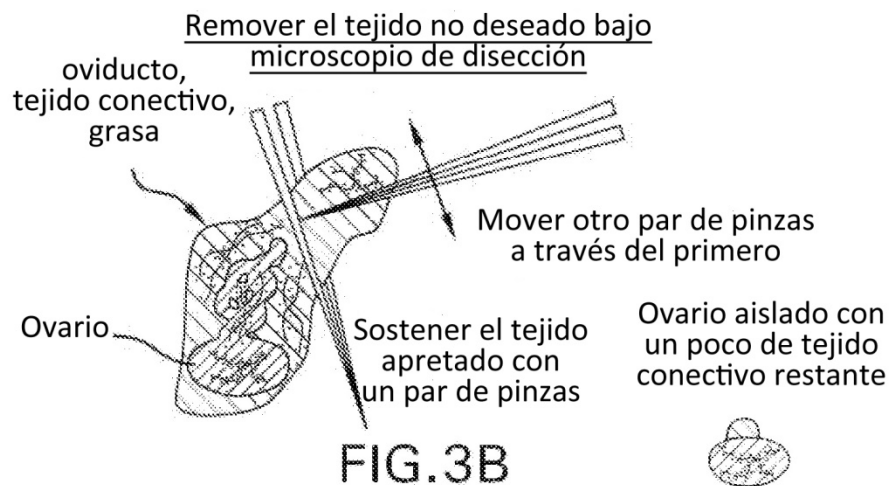


FIG.3B

Pocillos del sistema de cultivo

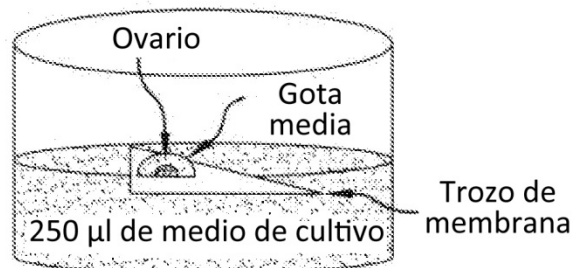


FIG.3C

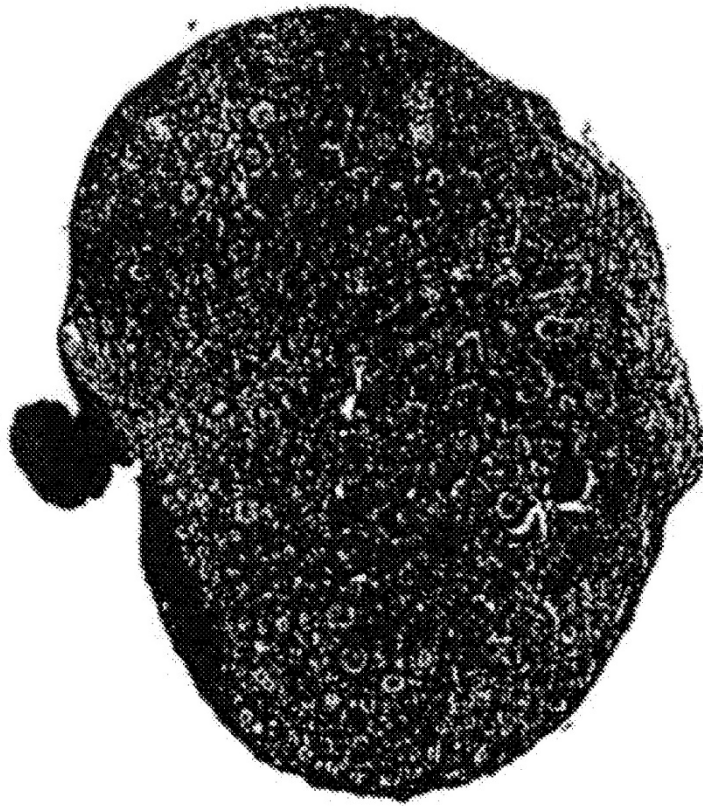


FIG.4

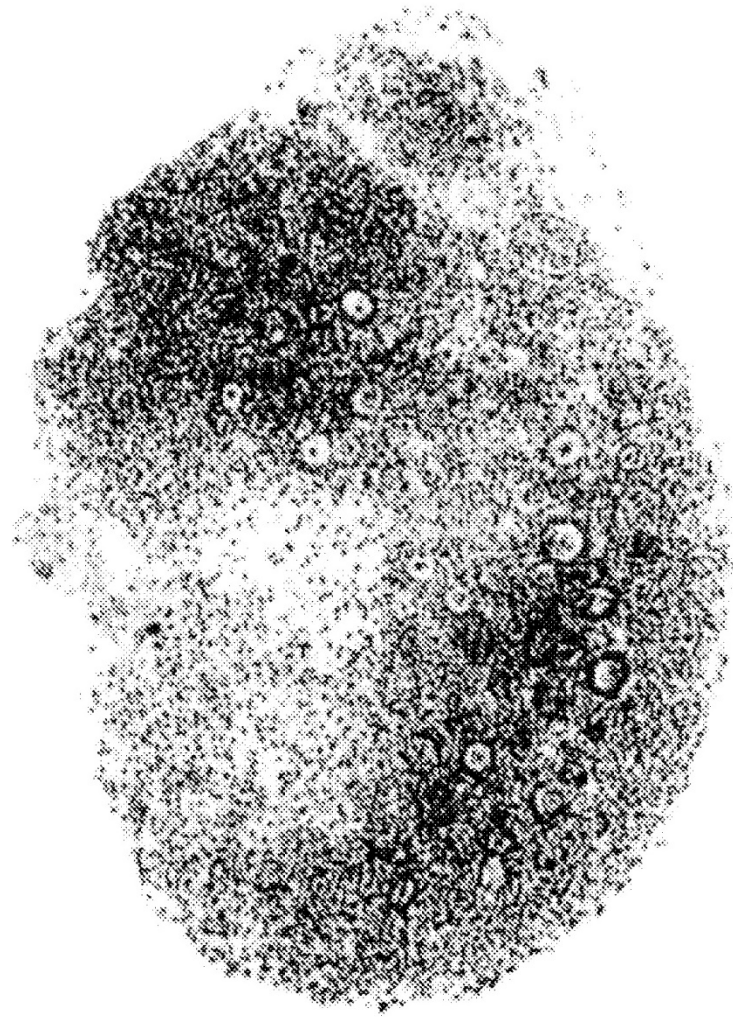
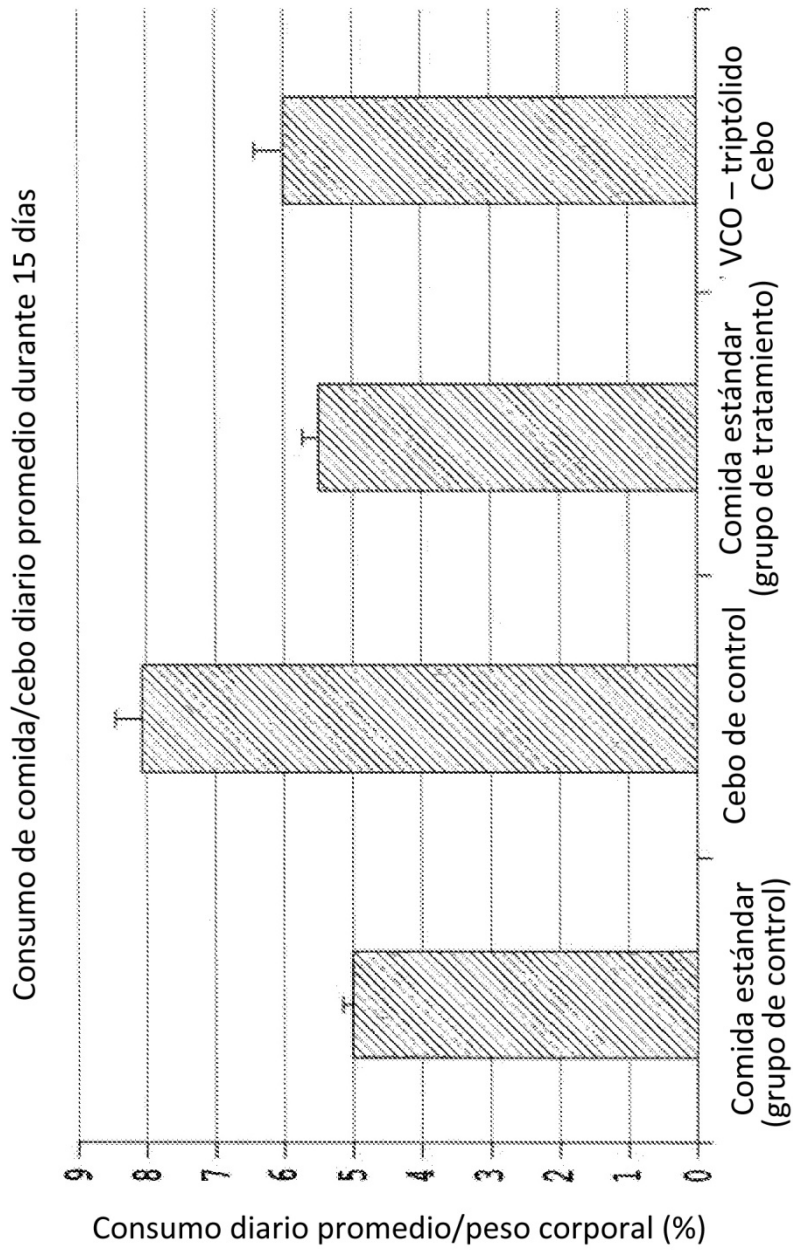


FIG.5



FIG.6



Las ratas Sprague Dawley de laboratorio hembras jóvenes tenían acceso a comida estándar junto con cebo de tratamiento ContrPest® durante 15 días consecutivos.

FIG. 7

Aumentos del peso corporal durante 15 días de ingestas de cebo

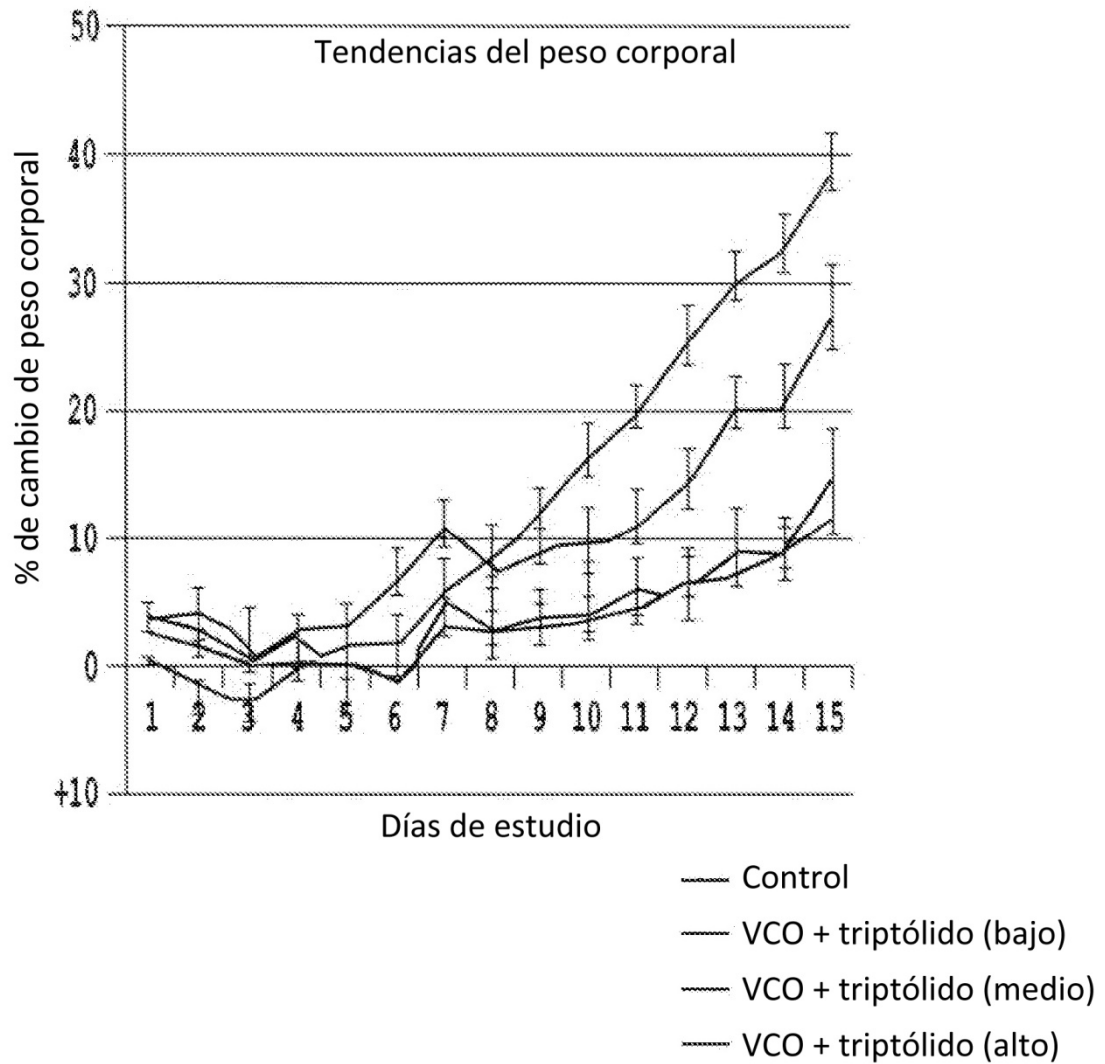


FIG. 8

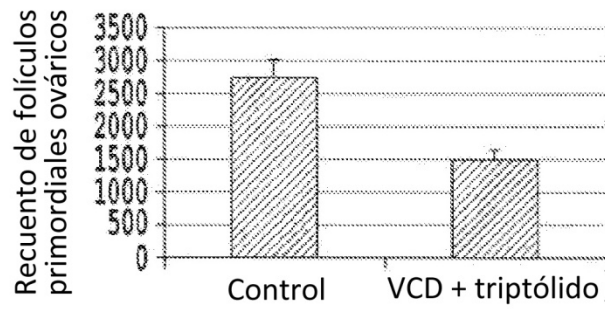


FIG. 9A

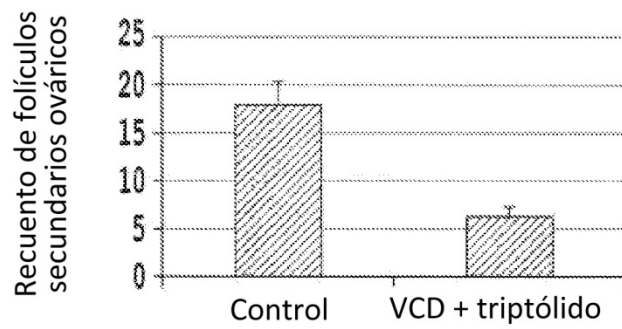


FIG. 9B

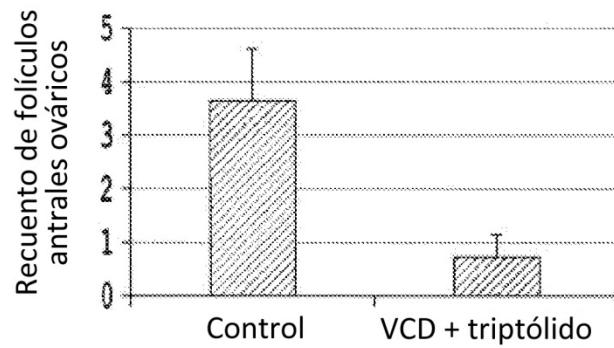


FIG. 9C

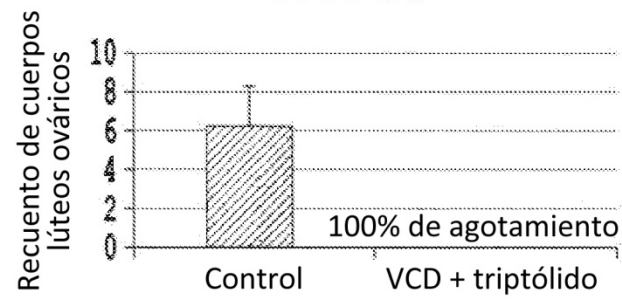


FIG. 9D

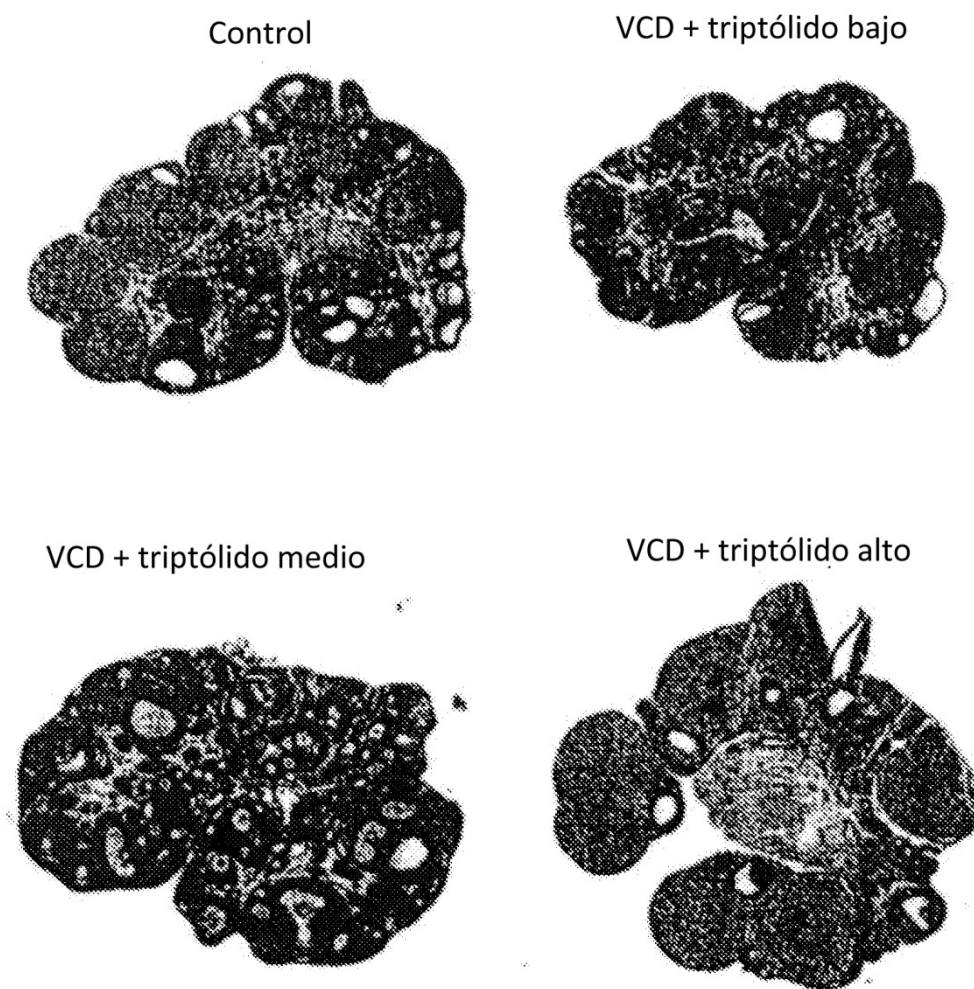


FIG.10

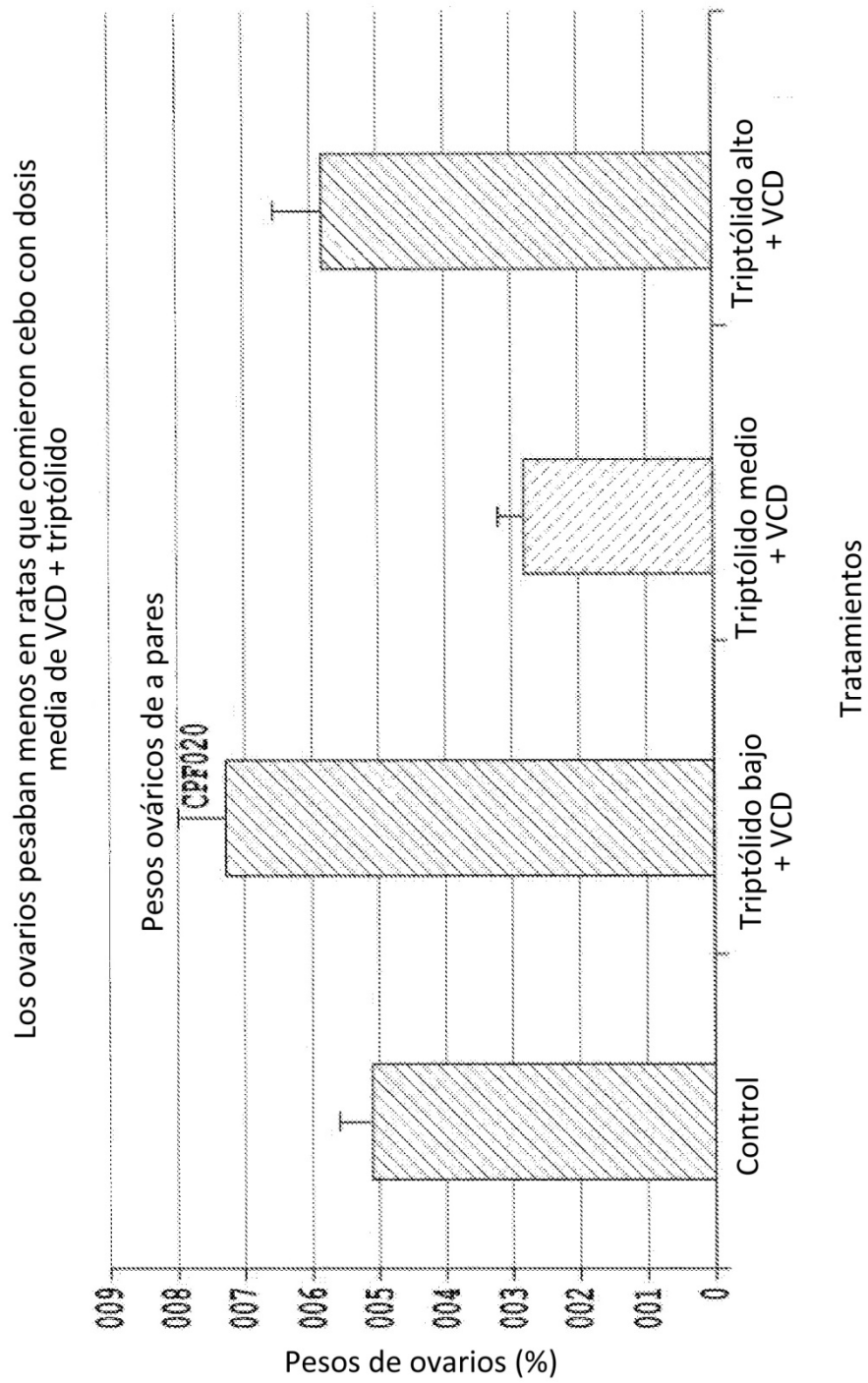


FIG. 11

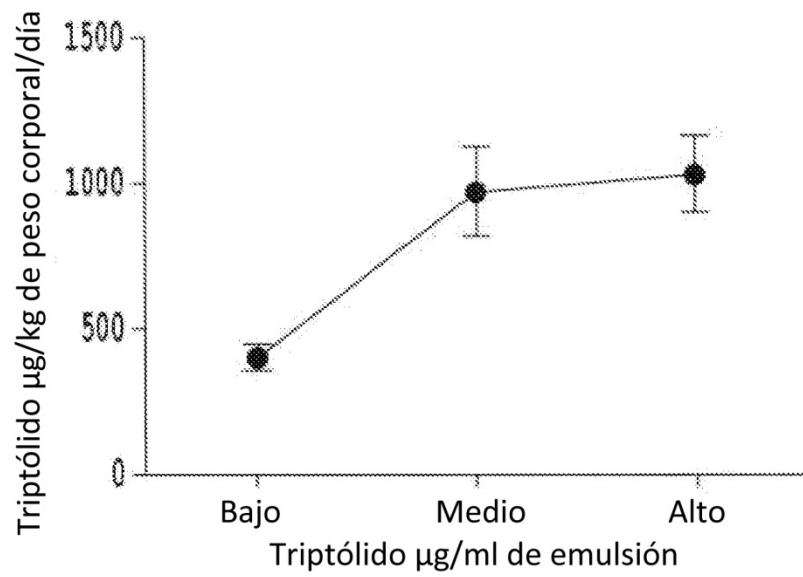


FIG. 12A

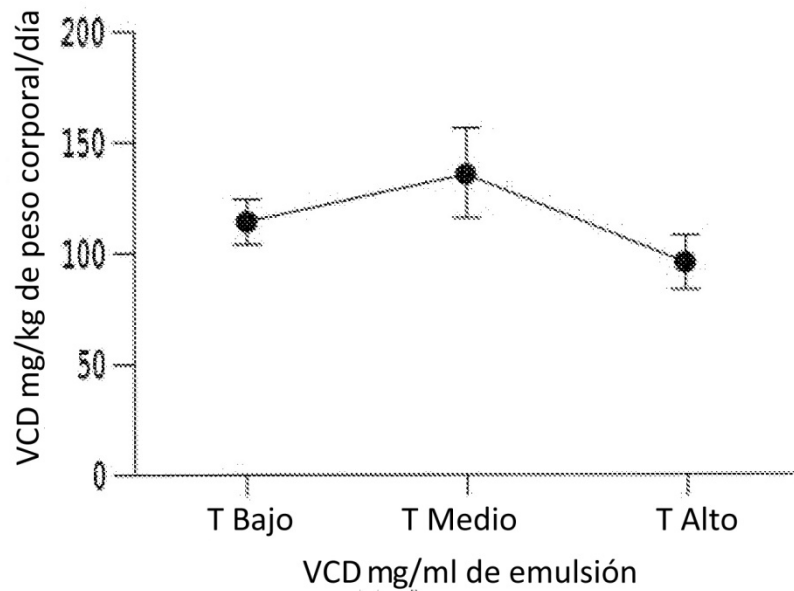


FIG. 12B

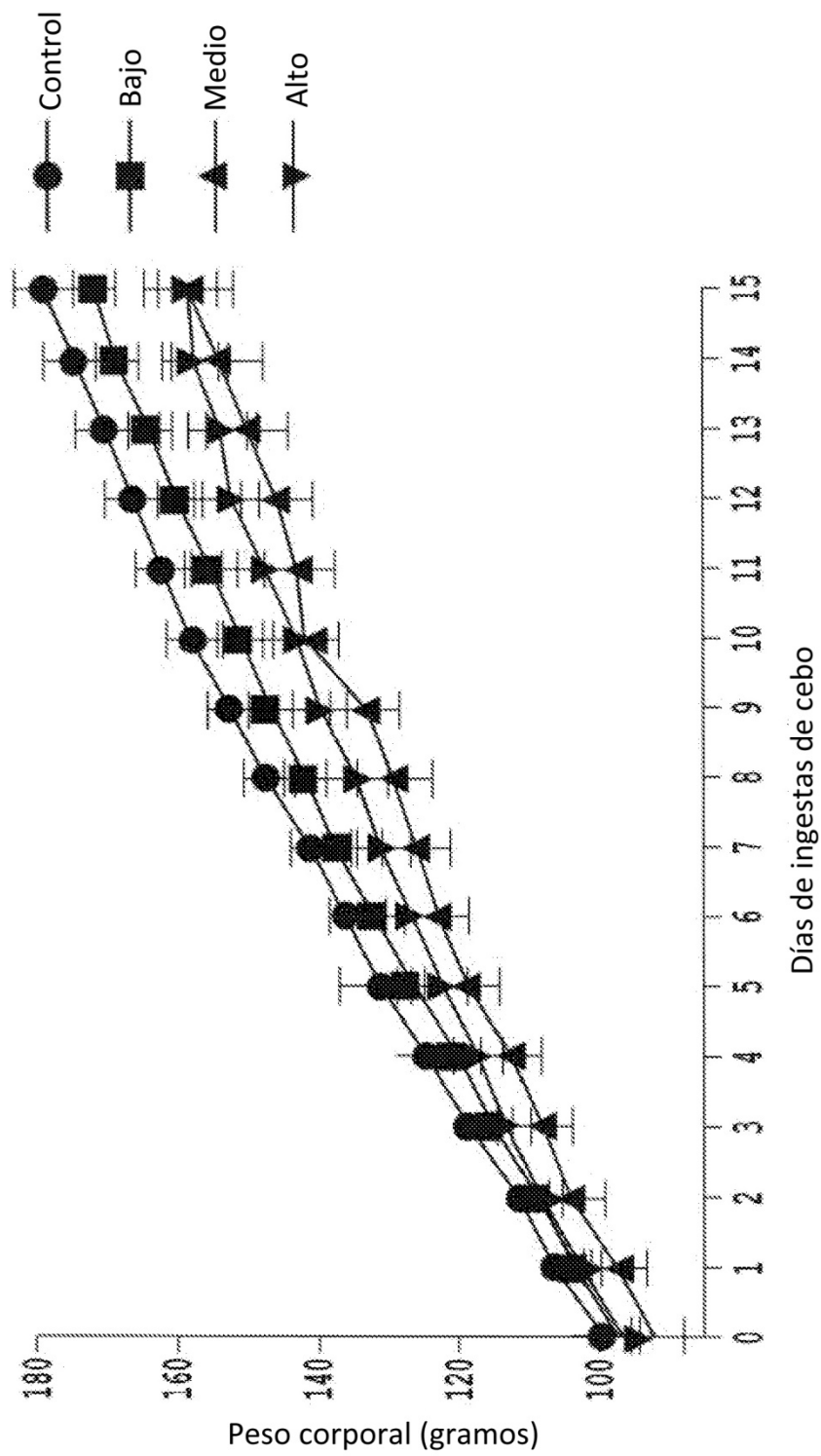


FIG. 13

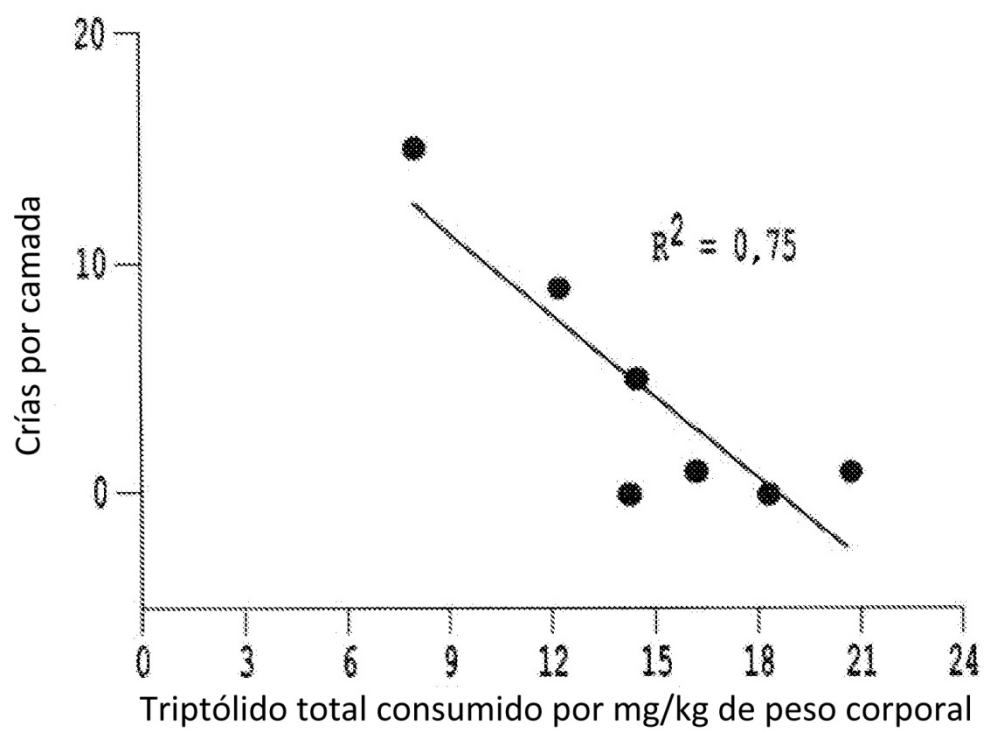


FIG. 14

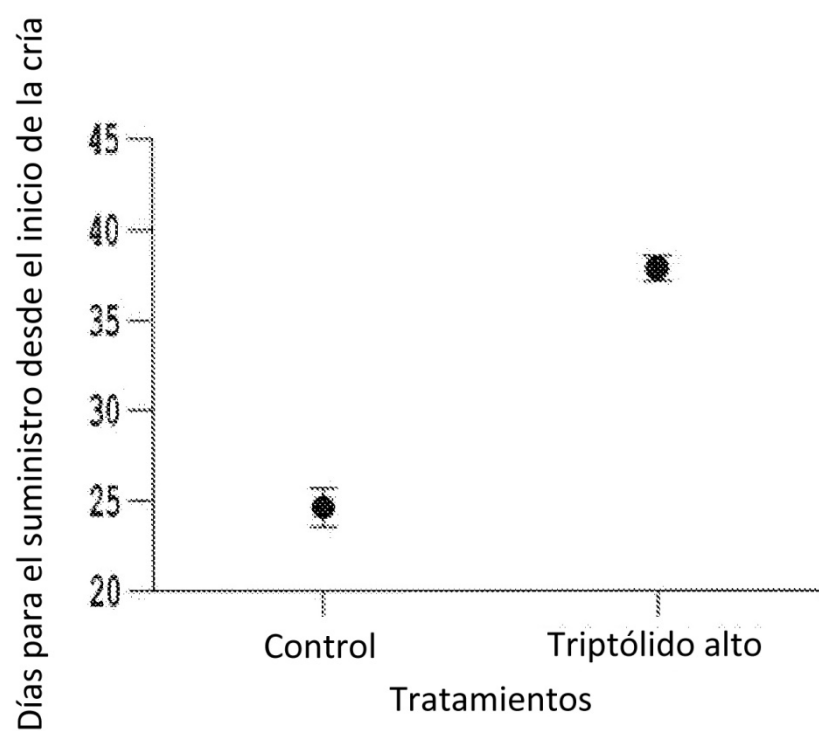


FIG. 15

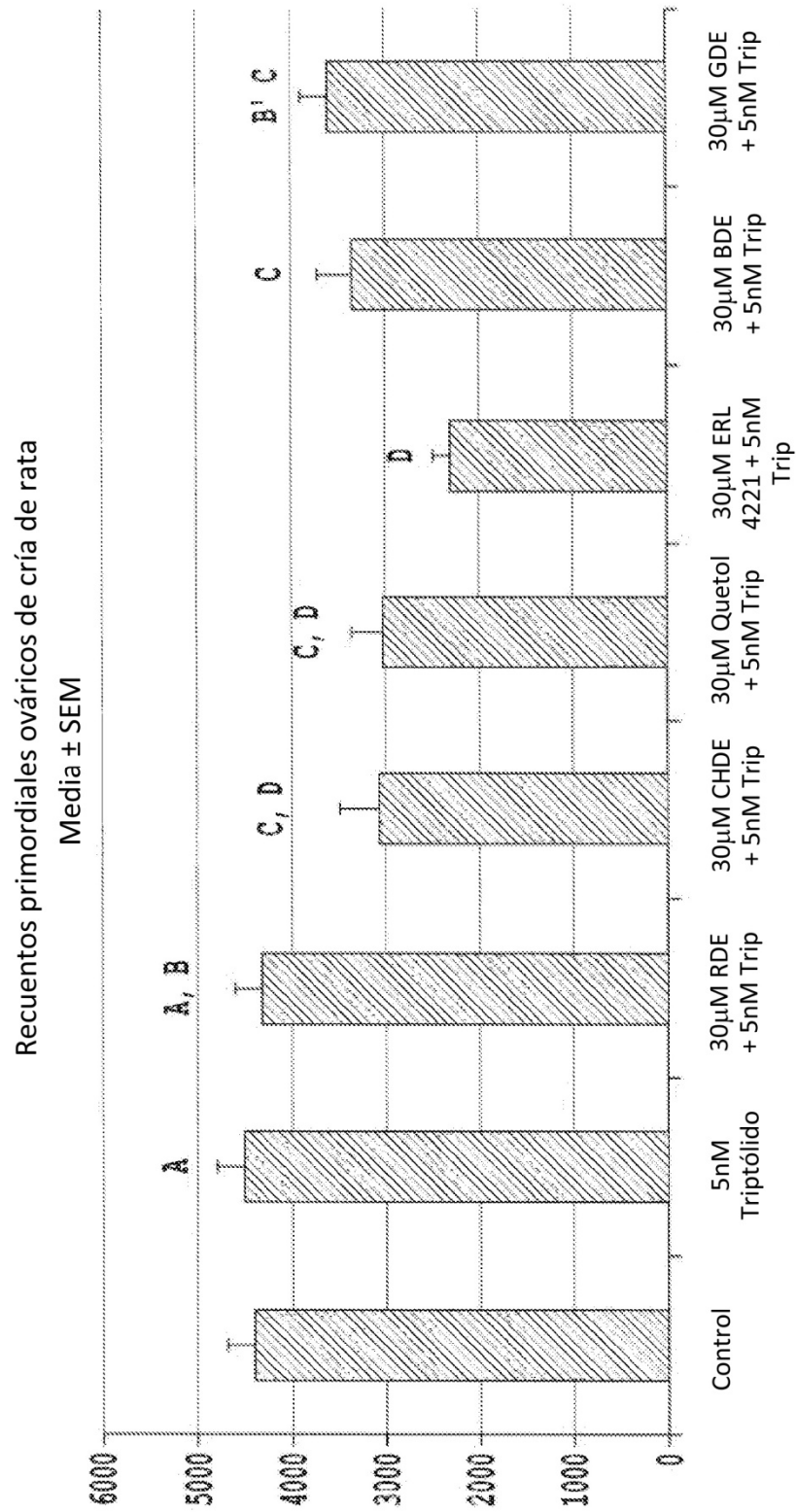


FIG. 16