

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 586**

21 Número de solicitud: 201132122

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/74** (2006.01)  
**C07K 5/06** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **28.12.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.04.2012**

71 Solicitante/s:  
**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA**  
Área de Valorización, Transferencia y  
Emprendimiento Edificio Emprendia, Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

72 Inventor/es:  
**REGAL LÓPEZ, Patricia;**  
**FENTE SAMPAYO, Cristina;**  
**CEPEDA SÁEZ, Alberto y**  
**SEIJAS VÁZQUEZ, Julio Antonio**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y KIT PARA DETERMINAR LA ADMINISTRACIÓN DE ESTRADIOL AL GANADO.**

57 Resumen:

Procedimiento y kit para determinar la administración de estradiol al ganado. Se divulga un procedimiento para determinar la administración exógena del 17 $\beta$ -estradiol a animales bovinos, basado en la determinación del péptido D-piroglutamil-L-fenilalanina en el suero de dichos animales. La presencia de dicho péptido en concentraciones superiores a las de los animales control indica la administración exógena de 17 $\beta$ -estradiol o un éster del mismo. También se proporciona un kit que comprende dicho péptido y que facilita la determinación. El procedimiento puede llevarse a cabo por diversas técnicas, tales como separación cromatográfica acoplada a espectrometría de masas, o técnicas de inmunoanálisis tales como ELISA.

ES 2 378 586 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y kit para determinar la administración de estradiol al ganado.

## CAMPO TÉCNICO

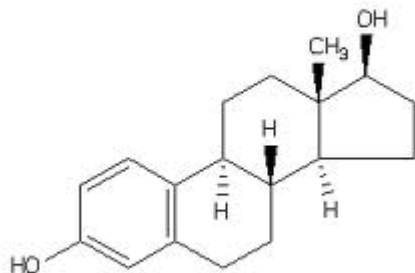
5 La invención se refiere al campo de la detección de sustancias en muestras tomadas de seres vivos que sirvan como marcadores de la administración o ingesta de alguna sustancia que se considere ilegal o que no deba administrarse por encima de unos determinados niveles. Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento para determinar la administración exógena del  $17\beta$ -estradiol a animales bovinos, así como a un kit preparado específicamente para tal fin.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Como cualquier otro animal, los animales destinados a la alimentación (ganado vacuno, porcino, ovino, aves de corral, peces...) sufren enfermedades que requieren la administración de medicamentos para su prevención o tratamiento. Estos medicamentos pueden dar lugar a residuos que permanecen en los productos alimenticios derivados de estos animales (carne, leche, huevos...).

15 Para garantizar la protección del consumidor, la Unión Europea ha establecido unos límites máximos de residuos (MRL) para algunas sustancias y, en algunos casos, ha prohibido su uso. Concretamente, la administración de hormonas esteroideas con acción estrogénica, androgénica o progestagénica, tanto con fines reproductivos como para promover el crecimiento del ganado, está prohibida por la Directiva 96/22/ECC. Sin embargo, sigue produciéndose, especialmente en los casos de producción intensiva de animales estabulados, donde se procura acelerar y mejorar el crecimiento de los animales, disminuyendo con ellos los tiempos de engorde y, en consecuencia, los costes de alimentación del ganado.

20 El  $17\beta$ -estradiol (conocido también simplemente como estradiol, oestradiol o también como E2, debido a la presencia de dos grupos hidroxilo en su estructura molecular) es una hormona esteroide femenina natural, que se puede considerar el estrógeno predominante durante la etapa reproductiva femenina, siendo el que presenta mayor concentración en suero. Durante la menopausia sigue estando presente, aunque los niveles de estrona son entonces superiores. También está presente en los hombres, en los que aparece como metabolito de la testosterona. Su fórmula es la siguiente:



30 Recientes evidencias respecto al uso de  $17\beta$ -estradiol indican que se debe considerar un carcinógeno completo, pues tiene capacidad tanto de iniciar tumores como de promoverlos. Por ello, y dado que existen productos alternativos en el mercado, en 2008 se prohibió permanentemente el uso de  $17\beta$ -estradiol y sus derivados tipo éster, incluso para uso terapéutico, mediante la Directiva 2008/97/EC. Sin embargo, la progesterona, un compuesto que se ha suministrado a menudo asociado al estradiol en la cría de animales, sigue estando permitida para uso terapéutico y tratamientos zootécnicos.

35 La administración exógena de hormonas naturales, tales como el  $17\beta$ -estradiol, progesterona, testosterona y algunos compuestos que dan lugar a las mismas al ser metabolizados por el propio organismo (prohormonas), ha sido siempre complicada de determinar, porque dichas hormonas se encuentran en el cuerpo de manera natural, producidas por el organismo como parte de su metabolismo endógeno, de manera que estos compuestos se encuentran siempre presentes en las muestras tomadas de los animales, haya o no habido administración ilegal de los mismos. Así, la simple presencia de estas sustancias no ha podido utilizarse para confirmar una administración exógena fraudulenta. También es difícil poder determinar la administración exógena de derivados tipo éster de dichos compuestos, especialmente en muestras de tejidos o fluidos corporales, porque son rápidamente metabolizados, dando lugar a compuestos con la estructura de los esteroides naturales (Stolker et al., 2009). El

establecimiento de niveles de referencia, cuya superación indicaría una administración de hormonas esteroideas o de prohormonas, ha demostrado ser difícil, no sólo porque los niveles de concentración de los esteroides naturales en los animales es muy variable, estando influenciada por múltiples factores internos y externos, sino porque, además, se ha encontrado que el tratamiento con testosterona o estradiol de bovinos da lugar a concentraciones iguales o menores en plasma de estos compuestos (Simontacchi et al., 2004; Scippo et al., 1994).

La cuantificación de moléculas sintetizadas en respuesta a estrógenos circulantes, como puede ser la vitelogenina, ha demostrado ser factible mediante el análisis de péptidos testigo, tal como se divulga por ejemplo en la solicitud US 2009/0011447. Los péptidos considerados como posibles candidatos a péptidos testigo se eligen entre los péptidos que resultan de la digestión de la propia proteína que se quiere analizar, por lo que la secuencia de los péptidos testigo finalmente elegidos coincide necesariamente con fragmentos de la secuencia de la proteína a determinar, siendo la digestión enzimática una etapa necesaria para llevar a cabo el método de la solicitud US 2009/0011447 en las muestras de peces que se quieren analizar. Dada la naturaleza esteroidea del estradiol, la progesterona o la testosterona, las estrategias análogas no parecen directamente aplicables.

Así, aunque se han desarrollado diversos métodos analíticos para detectarlas, aún sigue siendo un reto el diseño de procedimientos adecuados para demostrar la administración de hormonas de origen natural. Existe la necesidad, por tanto, de desarrollar métodos que permitan discriminar, de forma inequívoca, entre la presencia de dichas hormonas (o sus metabolitos) de forma natural y su presencia como consecuencia de una administración ilegal. Preferiblemente, el método debería ser aplicable a muestras fáciles de tomar, tales como el suero y la orina.

La presente invención proporciona una solución a este problema.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hallazgo de que el suero sanguíneo de animales tratados con estradiol presentan un metabolito de bajo peso molecular que parece ser característico de dichos animales, mostrando una relación de 0,08 entre la intensidad del correspondiente ion entre los animales sin tratar y los animales tratados. La dilucidación de su estructura permitió averiguar que se trata del dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina (D-Pyr-L-Phe). El compuesto es detectable, por ejemplo, acoplando técnicas de separación como las de cromatografía de alta resolución (como puede ser la cromatografía de gases) a técnicas de detección como la espectroscopía de masas.

Por tanto, la determinación de la concentración del péptido en el suero de ganado vacuno, y su comparación con la concentración en el suero de animales control, permite determinar si a un animal se le ha suministrado o no  $17\beta$ -estradiol de forma artificial, pues los animales a los que se les haya suministrado  $17\beta$ -estradiol presentarán un aumento significativo de la concentración de dicho dipéptido.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la administración exógena a animales bovinos de  $17\beta$ -estradiol o un éster del  $17\beta$ -estradiol que comprende las etapas de:

- a) determinar la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina en una muestra de suero tomada del bovino en estudio;
- b) comparar dicha concentración con un valor de referencia obtenido de muestras de suero de bovinos control que no han recibido  $17\beta$ -estradiol;
- c) concluir que ha habido administración exógena de  $17\beta$ -estradiol o un éster del mismo si el incremento de D-piroglutamil-L-fenilalanina en el suero del bovino en estudio respecto al valor de referencia es significativo.

Preferiblemente, los bovinos control que se utilicen para obtener el valor de referencia serán de la misma especie, más preferiblemente de la misma raza, y del mismo sexo.

La determinación de la concentración del dipéptido puede realizarse por un método análogo al seguido para su identificación por biomarcador (filtrado del suero y determinación de la presencia del dipéptido mediante HPLC-MS/MS), o mediante cualquier otro método alternativo conocido por los expertos en la materia como puede ser su detección mediante, por ejemplo, técnicas de ELISA (*enzyme linked immunosorbant assay*), o separación cromatográfica y detección por cualquier otro método alternativo a la MS/MS.

Sea cual sea el método de detección, su aplicación requerirá (o hará aconsejable) el uso del dipéptido como estándar interno. Por ello, la comercialización de dicho dipéptido para la aplicación en el procedimiento de la invención es interesante, especialmente como parte de un kit especialmente preparado para ser aplicado en el método de la invención.

Por ello, en un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit para determinar la administración exógena a ganado bovino de  $17\beta$ -estradiol o un éster del  $17\beta$ -estradiol, que comprende D-piroglutamil-L-fenilalanina. En el caso de que el método de la invención se lleve a cabo detectando el dipéptido mediante la técnica de ELISA u otra técnica de inmunoensayo, el kit en el que se comercialice comprenderá preferiblemente al menos un anticuerpo

específico que se una a dicho dipéptido y, preferiblemente, un anticuerpo secundario que se una al primero, y que permita identificar la unión entre el primer anticuerpo y su antígeno, al estar acoplado a cualquier reacción que dé lugar a un compuesto fácilmente identificable (tal como, por ejemplo, una sustancia coloreada).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Fig. 1 muestra los gráficos de valores resultantes del análisis PCA llevado a cabo sobre las huellas metabólicas obtenidas tras someter a HPLC acoplada a espectrometría de masas las muestras de suero de vacas sometidas a tratamientos hormonales con estradiol (panel A) o progesterona (panel B). La asociación entre los números indicados en los gráficos y los tratamientos es la siguiente:

10 - Panel A: 1 = control, 2 = tratado con  $17\beta$ -estradiol; 3 = tratado con benzoato de estradiol, 4 = tratado con benzoato de estradiol y progesterona. Todos los números 1 se localizan en la parte izquierda del gráfico, mientras los números 2 aparecen en la parte superior derecha y los números 3 en la parte inferior derecha, mientras los números 4 aparecen en su mayoría en la parte inferior derecha, aunque dos de ellos se sitúan en la parte superior derecha.

- Panel B: 1 = control; 2 = tratado con progesterona; 3 = tratado con progesterona y prostaglandina  $F2\alpha$ .

15 La Fig. 2 muestra el gráfico correspondiente al modelo predictivo resultante del análisis mediante OPLS-DA (*Orthogonal projections to latent structures – discriminant analysis*: análisis discriminatorio de proyecciones ortogonales a estructuras latentes) de 2/3 de los datos correspondientes a animales tratados con estradiol ( $17\beta$ -estradiol o benzoato de estradiol), utilizado para predecir la clasificación (animal control o tratado con estradiol) del 1/3 de datos restante. La asociación entre los números indicados en los gráficos y los tratamientos es la siguiente: 1 = control conocido, 2 = muestra tratada conocida, 3 = muestra clasificada como control, 4 = muestra clasificada como tratada. Se observa que todos los números 2 y 4 se encuentran en la parte derecha del gráfico, mientras que los números 1 y 3 están situados en la parte izquierda.

20 La Fig. 3 muestra la abundancia media en los sueros de animales control (primera barra de cada pareja) o tratados con estradiol ( $17\beta$ -estradiol o benzoato de estradiol) (segunda barra de cada pareja) de los candidatos a biomarcadores seleccionados tras el estudio estadístico de comparación de los sueros de animales control y animales tratados. Se indica el identificador (ID) de cada ion tras cada pareja de barras.

25 La Fig. 4 muestra sendos espectros de masas donde se demuestra la presencia del ion de relación masa/carga 277 (pico localizado en  $m/z = 277,10 - 277,14$ ) en muestras de suero provenientes de animales tratados con benzoato de estradiol (panel A) así como la baja concentración (ausencia) en muestras de suero provenientes de animales control (panel B). En cada espectro se indican los valores correspondientes al rango del tiempo de retención representado en el eje de abscisas (rango RT, indicado sobre el eje de ordenadas) así como los valores de pérdida neutra (valor NL, indicado en el extremo superior derecho de cada panel, sobre el rango  $m/z$  del pico).

30 La Fig. 5 muestra la abundancia relativa (intensidad de la señal detectada en el espectrómetro de masa en las muestras de animales tratados frente a muestras de animales control) de los iones obtenidos por fragmentación del compuesto M277T968 identificado como candidato a biomarcador en el estudio comparativo entre sueros de animales tratados con estradiol ( $17\beta$ -estradiol o benzoato de estradiol) y los animales control no tratados. El valor de abundancia relativa correspondiente a cada ion aparece representado en la posición del eje de abscisas correspondiente a su relación masa/carga ( $m/z$ ). En el extremo superior de las líneas verticales correspondientes a la abundancia relativa se indica el valor exacto (con 5 decimales) de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada ion y su tiempo de retención (R).

35 La Fig. 6 muestra la abundancia relativa (intensidad de la señal detectada en el espectrómetro de masa en las muestras de animales tratados frente a muestras de animales control) del ion correspondiente al compuesto M277T968, representada sobre la posición del eje de abscisas correspondiente a su relación masa/carga ( $m/z$ ). En el extremo superior de la línea vertical se indica el valor exacto (con 5 decimales) de la relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada ion y su tiempo de retención (R).

40 La Fig. 7 muestra el cromatograma de un suero control dopado con el biomarcador D-piroglutamil-L-fenilalanina.

45 La Fig. 8 muestra cromatogramas de iones extraídos (XIC) de las muestras de suero de animales tratados con diferentes productos veterinarios: benzoato de estradiol (panel A),  $17\beta$ -estradiol (panel B), y muestras control, sin ningún tratamiento hormonal (panel C) o tratadas con progesterona pero sin estradiol (panel D). Se indica la intensidad máxima, en cuentas por segundo (cps) en la esquina superior derecha de cada panel.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 Tal como se ha indicado previamente, la presente invención se refiere a un método para determinar la administración exógena de  $17\beta$ -estradiol a animales bovinos mediante la determinación de la concentración en suero de un péptido, D-Pyr-L-Phe, y su comparación con los niveles encontrados en animales control a los que no

se les haya suministrado estradiol de forma exógena. También se refiere a un kit específicamente diseñado para llevar a cabo el método de la invención.

Tal como se utiliza en la invención, se considera que una diferencia es significativa cuando el valor  $p$  es menor que 0,05. En este caso en concreto, sin embargo, dependiendo del método concreto utilizado para determinar la concentración del péptido en los animales control, puede resultar que el valor obtenido en dichos animales control sea 0. Por eso, a efectos de la aplicación del método de la invención, se considera también que la diferencia es significativa cuando no se detecta péptido en los animales control (valor 0) y sí se detecta en el animal en estudio.

Tal como se utiliza en la invención, el término "bovino" hace referencia a un animal perteneciente a la subfamilia *Bovinae*, compuesta por mamíferos ruminantes que presentan cuernos huecos permanentes, sin ramificaciones. En dicha subfamilia se incluyen los bovinos con joroba como el cebú (*Bos indicus*) y sin joroba como el toro o la vaca (*Bos taurus*), así como el yak (*Poephagus grunniens*), el mithan (*Bibos frontalis*), el banteng (*Bibos banteng*), el búfalo (*Bos bubalus bubalis*) y el bisonte, tanto el americano (*Bison bison*) como el europeo (*Bison bonasus*). En general, se trata de animales muy próximos desde el punto de vista evolutivo, especialmente en algunos casos como el del cebú y el toro, que son considerados a menudo como una misma especie, constituyendo el cebú la subespecie *Bos taurus indicus*, mientras el toro pertenecería a la subespecie *Bos taurus taurus*. El gran número de especies de la subfamilia *Bovinae* ha realizado una amplia gama de contribuciones a la alimentación y la agricultura, representando cerca del 30% de la carne mundial y más del 87% de la producción mundial de leche. De hecho, es habitual clasificar a los bovinos (en especial a las hembras) por su aptitud productiva, hablándose de bovinos con aptitud cárnica (aquellos que tienen interés comercial porque dan lugar a una cantidad de carne superior a la de otras razas y/o de características más apreciadas para su consumo que las de otras razas) o con aptitud lechera (aquellos cuyo interés comercial se debe principalmente a la producción de leche, como las hembras de *Bos taurus* conocidas tradicionalmente como vacas lecheras), aunque también hay bovinos con ambas aptitudes. Los *Bovinae* tienen también un gran valor por su aporte en el área de la tracción (transporte de familias y bienes, trabajo de la tierra para el cultivo) y por su estiércol, utilizado como combustible y como abono o fertilizante.

Aunque las clasificaciones varían, la subfamilia *Bovinae* puede considerarse incluida dentro de la familia *Bovidae*, más amplia, que incluye también otros animales tradicionalmente criados por el hombre y también de gran interés comercial, como las ovejas y las cabras.

Se prefiere que el bovino en estudio, es decir, el animal del cual se toma la muestra para analizar la posible administración exógena de  $17\beta$ -estradiol, sea de la misma raza que el animal o animales utilizados como bovinos control, a partir de los cuales se obtiene el valor de referencia. Más concretamente, tal como se utiliza en la presente invención, debe entenderse que se tiene particular preferencia por la especie con la cual se han llevado a cabo los ensayos que se presentan más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, la especie *Bos taurus* (entendiendo como tal la rama europea de la misma, es decir, los animales que para algunos autores constituyen la subespecie *Bos taurus taurus*, quedando excluida la rama asiática, la del cebú o *Bos taurus indicus*). A esta especie pertenecen los animales del sexo femenino en edad reproductiva (generalmente, de más de 13 ó 15 meses) conocidos como vacas, los animales del sexo masculino con capacidad reproductiva, generalmente de edad superior a 3 años, conocidos como toros, así como los animales adultos castrados del sexo masculino conocidos como bueyes y otros animales que aún no han alcanzado la edad reproductiva conocidos por diversos nombres tales como novillos, terneros, chotos...

Se prefiere que los animales a partir de los cuales se obtiene el valor de referencia sean del mismo sexo que el animal en estudio, y más preferiblemente del sexo femenino. Tanto el animal en estudio como los animales a partir de los cuales se obtiene el valor de referencia pueden estar en edad reproductiva o pueden ser de inferior edad a la reproductiva, prefiriéndose en cualquiera de las alternativas que exista coincidencia entre la condición del animal en estudio y los animales a partir de los cuales se obtiene el valor de referencia. Así, se tiene particular preferencia porque el bovino en estudio y los bovinos control sean vacas, es decir, animales del sexo femenino en edad reproductiva pertenecientes a la especie *Bos taurus*.

El valor de referencia de la muestra control puede haber sido obtenido ya sea con anterioridad al análisis de las muestras objeto de estudio o bien en el mismo momento del análisis de las muestras objeto de estudio.

La invención parte de un estudio metabolómico previo, llevado a cabo por los autores (Regal et al., 2010), recogido en el Ejemplo 1 de la presente solicitud, en el que se analizó la presencia en suero sanguíneo de sustancias de bajo peso molecular, en busca de posibles candidatos a metabolitos diferenciadores del tratamiento estrogénico. Los estudios metabolómicos se basan en la detección de moléculas pequeñas y en excluir biopolímeros de elevado tamaño como las proteínas, generando un juego de descriptores o compuestos testigo característicos de la matriz biológica en estudio en diferentes grupos experimentales. Aunque, tradicionalmente, la espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR) ha jugado un papel clave en el desarrollo de la metabolómica, siendo la herramienta preferida, en este caso, se prefirió recurrir a los sistemas que acoplan la separación por técnicas cromatográficas de alta resolución (cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC)) con técnicas de espectroscopía de masas (MS), pues la sensibilidad de estos sistemas es mayor que la de la NMR y actualmente puede considerarse que su reproducibilidad es elevada. En concreto, en el presente estudio, la separación de los metabolitos previa a su detección se llevó a cabo por cromatografía líquida acoplada a ionización a presión

atmosférica, para evitar cualquier problema derivado de la posible falta de estabilidad térmica de metabolitos que pudieran resultar útiles para el propósito de la invención.

Así, en el presente estudio, se recogieron muestras de suero de vacas lecheras tratadas o no con las hormonas sexuales empleadas con frecuencia para ser administradas al ganado (17 $\beta$ -estradiol o su éster de benzoato, y progesterona), y se adquirieron datos metabolómicos de los mismos, en un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (HPLC-LTQ-Orbitrap) y se sometieron a diversos análisis estadísticos, pudiéndose comprobar modificaciones metabolómicas significativas en el suero tras la administración de estradiol y/o progesterona.

Para ello, utilizaron 24 vacas de raza Holstein en edad reproductiva (de entre 24 meses y 5 años de edad), y las dividieron en tres grupos distintos, a cada uno de los cuales les administraron 17 $\beta$ -estradiol por una vía diferente. Se recogieron muestras de suero de cada una de ellas entre 3 y 6 días después de la administración del estradiol, y se realizó un análisis metabolómico de los mismos, tras la eliminación de las proteínas de alto peso molecular (centrifugación y/o filtración). También se recogieron muestras de animales control, a los que no se les suministró 17 $\beta$ -estradiol.

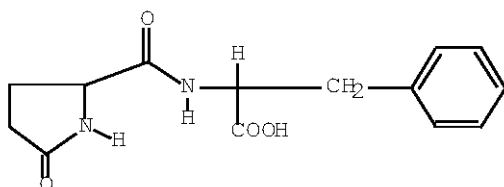
Las muestras de suero fueron analizadas acoplando técnicas de cromatografía de alta resolución (en concreto, cromatografía de gases), para conseguir una separación completa de los metabolitos antes de su detección, con técnicas de detección mediante espectroscopía de masas. Con ello, se analizó la presencia en suero de sustancias de bajo peso molecular. De entre los distintos metabolitos analizados, se realizó una selección de los mismos mediante la ayuda de un software estadístico.

De entre los diversos metabolitos analizados, se encontró que sólo uno de ellos parecía ser característico del suero de animales tratados con estradiol. El compuesto, al ser analizado en un espectrógrafo de masas tipo Orbitrap, presentaba un valor de  $[M+H]^+$  (valor  $m/z$ ) de 277,118 y un tiempo de retención de 16,18.

A partir de los datos del estudio previo, los autores de la invención identificaron la estructura química del compuesto. Aunque existen bases de datos donde, a partir del ratio  $m/z$ , se puede dilucidar la estructura de un compuesto, en el presente caso, disponiendo sólo de la relación masa/carga de los iones sólo con tres decimales y sin haberse determinado ni la carga de los mismos, ni los posibles fragmentos  $ms2$  y  $ms3$  (posibles roturas de la molécula que ayudan a dilucidar su estructura), el número de posibles compuestos compatibles resultaba inmensa, por lo que la estructura final del compuesto inicialmente detectado puede considerarse a priori no obvia y prácticamente impredecible.

Por ello, se intentó obtener datos estructurales adicionales, fragmentando el compuesto mediante espectrometría de masas en tándem, tal como se describe en el Ejemplo 2. El ensayo, del que se muestran los correspondientes gráficos en la Fig. 5, dio resultado a la formación de cuatro iones diagnóstico dominantes ( $m/z$  231,  $m/z$  166,  $m/z$  259 y  $m/z$  120). La espectrometría de masas de alta resolución permitió obtener por primera vez la masa del ion con precisión:  $m/z$  277,11963.

Incluso tras la selección de los biomarcadores potenciales, la identificación precisa de los mismos demostró ser muy complicada, por seguir siendo muy alto el número de posibles compuestos compatibles. También ha de tenerse en cuenta que las bases de datos existentes, como KEGG, METLIN o PubChem, que incluyen datos como la masa exacta, la composición elemental, o datos MS/MS, para varios metabolitos conocidos, son un buen punto de partida para evaluar los datos de espectrometría de masas, pero su utilidad está limitada porque están incompletas. Por ello, el estudio se complementó con una investigación bibliográfica exhaustiva. Finalmente, se encontró que los datos disponibles para el compuesto detectado en el suero de animales bovinos eran compatibles con los correspondientes al dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina (D-Pyr-L-Phe). La estructura química de dicho compuesto es la siguiente:



La verificación de la identidad del compuesto requirió la síntesis química del mismo (descrita en el Ejemplo 3), la optimización del método de HPLC-MS/MS inicialmente utilizado para la identificación del mismo y la confirmación de la presencia del dipéptido D-Pyr-L-Phe en las muestras de suero de animales a los que se les había suministrado  $\beta$ -estradiol o un éster del mismo, el benzoato de estradiol (todo ello descrito en el Ejemplo 3). Todo ello permitió confirmar, que, efectivamente, el dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina era el compuesto que parecía ser característico de los animales tratados con 17 $\beta$ -estradiol o un éster del mismo.

Por tanto, la determinación de la concentración del péptido D-piroglutamil-L-fenilalanina en el suero de ganado vacuno y la comparación de sus niveles con datos de controles permite determinar si un animal ha recibido estradiol (como 17 $\beta$ -estradiol o como uno de sus ésteres) administrado de forma artificial, pues los animales a los que se les haya suministrado estradiol presentarán un aumento significativo de la concentración de dicho dipéptido.

5 La existencia del péptido D-piroglutamil-L-fenilalanina en la naturaleza era conocida, pues su presencia en setas, por ejemplo, había sido divulgada ya por Altamura y colaboradores (Altamura et al., 1970). Su existencia también puede considerarse divulgada por la solicitud WO2010032322 como un péptido con actividad antiinflamatoria. Otros autores lo han utilizado como herramienta de ensayo. Así, por ejemplo, Fujiwara y sus colaboradores (Fujiwara et al., 1979) lo han utilizado para estudiar la especificidad de la pirrolidona carboxil peptidasa de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a L-piroglutamil aminoácidos y frente a varias hormonas peptídicas cuyo aminoácido terminal es piroglutámico. Sforza y colaboradores (Sforza et al., 2009), por su parte, han demostrado su utilidad como patrón a partir del cual identifican dipéptidos de piro-glutámico responsables de la maduración del queso Parmigiano-Regiano. Los datos publicados en este último artículo, además, han sido de utilidad para poder identificar la estructura concreta del compuesto detectado por los autores de la presente invención en el suero de animales bovinos a los que se había suministrado estradiol. Pero en ninguno de los citados documentos se hace mención alguna a una posible relación entre el dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina y la administración exógena de estradiol a ganado bovino.

20 Los datos divulgados en la presente solicitud suponen la primera indicación de que la administración exógena de estradiol pudiera dar lugar a un incremento de la concentración del compuesto D-piroglutamil-L-fenilalanina. Tampoco se ha sugerido previamente que la administración exógena de estradiol pueda determinarse basándose en la evaluación de la presencia y concentración de dicho dipéptido. Si bien es cierto que la determinación de péptidos testigos en general es una práctica conocida para sacar conclusiones respecto a la posible presencia de otras moléculas relacionadas y/o la concentración en la que se encuentran en el plasma e, incluso, se ha sugerido su aplicación para la cuantificación de moléculas sintetizadas en respuesta a estrógenos circulantes, como puede ser la vitelogenina, (véase como ejemplo la solicitud US 2009/0011447), nunca se ha hecho mención de una posible utilidad de la D-piroglutamil-L-fenilalanina para determinar la administración de estradiol al ganado, especialmente al bovino. Las secuencias de péptidos testigos reflejadas en la citada solicitud US 2009/0011447, por ejemplo, no coinciden ni son similares a la D-piroglutamil-L-fenilalanina. Tampoco la estrategia seguida para elegir el péptido tiene ninguna similitud con la de la presente invención, pues la estrategia utilizada en el documento US 2009/0011447 es la de recurrir al análisis de péptidos que resultan de la digestión de la proteína que se quiere analizar, la vitelogenina, mientras que en el desarrollo de la presente invención no se ha partido de la secuencia previamente conocida de ninguna proteína. Por tanto, los conocimientos divulgados en la solicitud US 2009/0011447 no sugieren en absoluto una posible utilidad de la determinación de la D-piroglutamil-L-fenilalanina para determinar si podría haber habido administración exógena de estradiol.

35 Ni siquiera los datos previos obtenidos por los autores de la presente invención hacían obvio pensar que la D-piroglutamil-L-fenilalanina pudiera ser un compuesto cuya concentración permitiera determinar la administración exógena de estradiol. El estudio inicial de los autores sólo permitía conocer el valor M+H (es decir, la relación carga masa ( $m/z$ )) con tres decimales, de los iones correspondientes al compuesto identificado en suero como compuesto indicativo de administración de estradiol. Se desconocía el número de cargas que podían presentar los iones, la masa molecular exacta (al menos con cuatro decimales) o los fragmentos ms2 y ms3, es decir, los fragmentos resultantes de la posible rotura de la molécula. Sin ninguno de esos datos, los candidatos no sólo son muy numerosos (miles), sino que, además, incluyen compuestos diversos con estructuras químicas y propiedades bastante diferentes. En todas las bases de datos que se puedan usar para encontrar la molécula, hay que tener por lo menos su espectro de masas con las posibles roturas: con un dato tan simple como es la relación  $m/z$ , además con sólo tres decimales, habría sido imposible identificar el dipéptido que se utiliza en el método de la invención. Incluso asumiendo que el ion tuviera una única carga (dato para el cual no había ninguna indicación, que tuvo que ser confirmado en estudios posteriores), las posibilidades siguen siendo muy numerosas.

50 Una vez identificado el péptido, sin embargo, la determinación de su concentración puede realizarse a partir de suero, requiriéndose unos pasos de preparación de la muestra mínimos: extracción de sangre, obtención de suero, congelación y descongelación del mismo (en caso de que no vaya a ser procesado de inmediato) y, preferiblemente, filtración para eliminar proteínas de alto peso molecular. Tras esta preparación, la determinación de la presencia del dipéptido puede realizarse por un método análogo al seguido para su identificación como biomarcador (separación inicial de los componentes del suero mediante HPLC, acoplada a espectroscopía de masas), o mediante cualquier otro método alternativo conocido por los expertos en la materia como puede ser separación cromatográfica y detección por cualquier otro método alternativo a la espectroscopía de masas. En este caso particular, además, dado que el compuesto identificado es de naturaleza peptídica, puede recurrirse a métodos inmunológicos para su detección, como puede ser por ejemplo, técnicas de ELISA.

60 En el caso de que en la separación se apliquen técnicas cromatográficas, preferiblemente acopladas a detección por espectrometría de masas, se prefiere que se lleve a cabo previamente la etapa de filtración del suero para eliminar proteínas de alto peso molecular. Posteriormente, los componentes remanentes pueden separarse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases de alta resolución. La presencia de D-piroglutamil-L-fenilalanina en la muestra de suero analizada puede luego determinarse mediante la

aplicación de técnicas de espectrometría de masas. Si se utilizan técnicas de ionización electrospray en las que se generan iones de una única carga positiva, la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina puede entonces determinarse a partir de la señal correspondiente al ion característico para este dipéptido, cuyo valor  $m/z$  es próximo a 277 (que puede estar, por ejemplo, comprendido entre 277,10 y 277,14, como sucedió en el caso del ensayo mostrado en la Fig. 4). Aprovechando los datos que se aportan en los Ejemplos 2 y 3 de la presente solicitud respecto a los fragmentos característicos generados a partir del ion característico del dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina, el ensayo puede realizarse con espectrometría de masas en tándem (MS/MS), técnica que implica la existencia de más de un paso de selección de componentes mediante espectrometría de masas, induciéndose alguna forma de fragmentación entre los distintos pasos, tal como se propone en el Ejemplo 3 de la presente solicitud. En dicho Ejemplo, en el que se indican las condiciones de la espectrometría de masas optimizadas para la intensidad máxima de la señal mediante la infusión directa del estándar de D-Pyr-L-Phe en la fuente que produce la ionización electrospray (ESI), se propone controlar tres transiciones MRM (ion padre a ion hijo) verificando la presencia en la muestra de suero del bovino en estudio de un ion de  $m/z$  277 como ion característico en ESI(+) y la aparición de al menos tres iones hijos de valores de  $m/z$  120, 166, y 231. En cualquier caso, para la aplicación de este tipo de técnicas, es siempre preferible que el ensayo en el que se determine la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina incluya un patrón de dicho dipéptido, para poder verificar que el ion característico medido, su tiempo de retención y, en su caso, los iones hijos generados, se corresponden en sus características con los datos observados para el patrón (estándar).

Por su parte, la aplicación de métodos de inmunoensayo, como ELISA, requiere la preparación de anticuerpos que reconozcan el dipéptido, preferiblemente monoclonales. La generación de anticuerpos frente a un polipéptido cualquiera es una técnica habitual, conocida por cualquier experto en la técnica, que puede considerarse rutinaria para cualquier experto en la técnica, y puede encontrarse información al respecto incluso en los folletos informativos de las casas suministradoras de reactivos para llevarlos a cabo, incluidas las versiones de los mismos accesibles a través de Internet, como es el caso, por ejemplo, de la información suministrada por la casa Cultek S.L.U. (Madrid, España) ([http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_Anticuerpos&opc=tecnicas](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Anticuerpos&opc=tecnicas)). Para ello, hay que inyectar la molécula contra la cual se desea obtener anticuerpos a un animal que la reconozca como no propia por los componentes del sistema inmune. Los animales que se utilizan habitualmente son conejos, ratones, ratas, cobayas, cabras, caballos, ovejas, vacas y llamas. En este caso, es preferible no recurrir a vacas, teniendo preferencia por conejos, ratones, ratas o cobayas. Además, dado el pequeño tamaño del dipéptido D-Pyr-L-Phe, es conveniente incrementar su inmunogenicidad antes de inyectárselo al animal elegido, uniendo el dipéptido a una molécula portadora, generalmente una proteína de mayor tamaño y complejidad, a la que se alude generalmente con el término inglés "*carrier*", y que dará lugar a que el animal produzca anticuerpos tanto contra el dipéptido D-Pyr-L-Phe como contra el *carrier*. Los dos más utilizados son la hemocianina de lapa (KLH: *Keyhole Limpet Hemocyanin*) y la albúmina de suero bovino (BSA). Para incrementar la respuesta inmune puede utilizarse, además, un adyuvante, tales como el bien conocido adyuvante de Freund que, al inyectarse mezclado con el inmunógeno (dipéptido D-Pyr-L-Phe unido al "*carrier*"), actuará como estimulador no específico de la respuesta inmune, causando un aumento de la respuesta de anticuerpos. En general, se tiene preferencia por los anticuerpos monoclonales, que son anticuerpos homogéneos producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que garantiza su perpetuidad (Köhler & Milstein, 1975). Con esta fusión de dos células, una programada para producir un anticuerpo específico pero que no se multiplica indefinidamente (linfocito) y otra inmortal con gran capacidad de crecimiento pero que no produce inmunoglobulina (célula de mieloma), se combina la información genética necesaria para la síntesis del anticuerpo deseado y una capacidad de síntesis proteica, permitiendo su multiplicación indefinida tanto *in vitro* como *in vivo*. Para la producción de anticuerpos frente al dipéptido D-Pyr-L-Phe, los autores de la presente invención tienen preferencia por la metodología descrita por Iglesias *et al.* (1997). Brevemente: se fusionan esplenocitos obtenidos de ratones BALB/c hembras, previamente inyectadas intraperitonealmente con el inmunógeno (en este caso, el dipéptido D-Pyr-L-Phe, unido a un *carrier*), con células de mieloma murino X63-Ag8.653, en presencia de 50% de polietilenglicol (PEG) 4000 (Boehringer Mannheim, Barcelona, España). Los cultivos de hibridomas se pueden mantener según lo descrito por Estévez *et al.* (1994). Posteriormente, se obtienen los anticuerpos monoclonales anti-AniSerp a partir del líquido ascítico de ratones inyectados, vía intraperitoneal, con las células del hibridoma seleccionado ( $2 \times 10^6$  células/ratón, por ejemplo). La purificación parcial de los anticuerpos se puede realizar mediante precipitación de la ascitis con sulfato amónico saturado (SAS). En cualquier caso, actualmente en España son muchas las compañías biomédicas especializadas en la producción de anticuerpos monoclonales a la carta (como, p. ej., Antibody BCN, de Bellaterra, Barcelona), a las que se puede encargar su producción.

El anticuerpo específico puede marcarse con cualquier metodología conocida por los expertos en la materia para facilitar la detección del dipéptido en una muestra. En el caso de la técnica de inmunoensayo utilizada para detección del dipéptido sea la técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), es una técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o alguna otra señal. La aparición de colorantes permite medir indirectamente, mediante espectrofotometría, el antígeno en la muestra. Entre las alternativas a la generación de compuestos coloreados destacan la variante conocida como quimioluminiscencia, donde se mide la aparición o desaparición de sustratos que emiten luz, que se detecta mediante un luminómetro o mediante su capacidad para sensibilizar una placa fotográfica. Así, por ejemplo, la oxidación del compuesto luminol por peróxido de hidrógeno y la enzima



peroxidasa de rábano (HRP), produce luz; si el luminol se sustituye, por ejemplo, por o-fenilendiamina, la reacción con el peróxido de hidrógeno da lugar a un producto amarillo-anaranjado también fácilmente medible.

Es muy común que en este tipo de ensayos, se utilice un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada, variante a la que se alude a veces como ELISA indirecto. Se prefiere la utilización de esta última técnica, por la gran versatilidad que ofrece, pues existen una gran variedad de anticuerpos secundarios comercialmente disponibles, acoplados a muy diversas enzimas, para cuya elección el detalle principal a tener en cuenta es el animal en el cual se originaron los anticuerpos primarios, cuya región constante deberá ser reconocida por el anticuerpo secundario. Se tiene preferencia por la utilización de este tipo de técnicas de ELISA, de manera que la concentración del producto generado por la enzima unida al anticuerpo secundario (deducida a partir de la intensidad de la señal detectable en ese producto, ya sea el cambio de color producido al aparecer el mismo, o la aparición de una señal luminosa) servirá para determinar la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina en la muestra de suero en estudio. Para ello, la realización del ensayo con un patrón de D-piroglutamil-L-fenilalanina, de concentración conocida, será una herramienta de gran utilidad para determinar la concentración de dicho dipéptido en la muestra en ensayo, por comparación de la intensidad de las señales obtenidas con cada una de las concentraciones del patrón y la señal correspondiente a la muestra en ensayo.

En las realizaciones del método de la invención en la que se utilicen técnicas de inmunoensayo con anticuerpos específicos contra el dipéptido, la filtración del suero previamente a la aplicación del método es menos importante que en el caso de aplicarse, por ejemplo, técnicas cromatográficas para la separación de componentes, aunque también es preferible llevar a cabo esta etapa previa para evitar posibles reacciones cruzadas con proteínas que puedan contener el dipéptido en su secuencia.

Sea cual sea la técnica utilizada, la determinación de la concentración del péptido en el suero de ganado vacuno, y su comparación con la concentración en el suero de animales control, permite determinar si a un animal se le ha suministrado o no estradiol de forma artificial, pues los animales a los que se les haya suministrado  $17\beta$ -estradiol o uno de sus ésteres presentarán un aumento significativo de la concentración de dicho dipéptido. En el caso concreto de la utilización de la técnica de ELISA, es conveniente llevar a cabo el ensayo realizándolo simultáneamente, y en las mismas condiciones, con muestras de suero tomadas de animales de los que se tenga seguridad que no han recibido estradiol suministrado exógenamente, muestras que constituirán las muestras control de las cuales extraer el valor de referencia de la señal; la comparación de dicha señal con la señal obtenida de las muestras del animal en estudio permitirá determinar si el mismo ha recibido o no estradiol.

En cualquiera de los posibles métodos de detección, su aplicación requerirá (o hará aconsejable) el uso del dipéptido como estándar interno (patrón), por lo que los kits que comprendan dicho dipéptido son un complemento de gran utilidad y posible interés comercial para llevar a cabo el procedimiento de la invención. En el caso de recurrirse a la técnica de ELISA u otra técnica de inmunoensayo, el kit debería comprender también, preferiblemente, al menos un anticuerpo específico que se una a dicho dipéptido. Una posible realización de particular interés es aquella en la que el kit comprende también, preferiblemente, un anticuerpo secundario que se une al primero, y que permita identificar la unión entre el primer anticuerpo y su antígeno, al estar acoplado a una enzima que catalice una reacción que dé lugar a un compuesto fácilmente identificable (tal como, por ejemplo, una sustancia coloreada, cuyo color es fácilmente distinguible del color del sustrato, o una sustancia capaz de emitir luz, que puede o no ser luz visible para el ojo humano, pero que debe ser fácilmente detectable y cuantificable por medios técnicos disponibles). Para la detección del dipéptido mediante ELISA, es conveniente también que el kit comprenda, adicionalmente, el o los sustratos químicos sobre los cuales deba actuar la enzima, así como el tampón adecuado para que actúe la enzima o una solución que, tras ser diluida, dé lugar a una solución en la que la enzima sea activa.

Los ensayos mostrados en los Ejemplos de la presente solicitud, en los que el descubrimiento y dilucidación de la estructura del péptido se realizaron mediante separación por HPLC acoplada a técnicas de espectroscopía de masas (MS), demuestran también el interés de llevar a cabo el método de la invención disponiendo de un patrón del péptido que se quiere detectar y, por tanto, el interés comercial de los kits que lo contengan. Así, en los ensayos de identificación de posibles moléculas marcadoras y dilucidación de la estructura del compuesto identificado mediante las mismas, la separación se realizó con un sistema de HPLC acoplado a MS que incorporaba un espectrómetro tipo Orbitrap, un aparato bastante preciso, que permitió obtener la masa del péptido con cinco cifras decimales. Los ensayos para confirmar la presencia de D-piroglutamil-L-fenilalanina en el suero de animales tratados con estradiol incorporaba un sistema de HPLC distinto, acoplado a un espectrómetro de masas tipo Q-Trap, un triple cuadrupolo sencillo que no es capaz de ser tan preciso ni de proporcionar tantas cifras decimales; esta es la causa de que en distintos puntos de la presente solicitud se indiquen los valores de la relación  $m/z$  del dipéptido a detectar en las muestras con un número distinto de decimales, lo que también ocurre con los fragmentos generados a partir del mismo. Por esa razón también, en las definiciones del método de la invención en las que se indican valores  $m/z$ , se han redondeado todos los valores obtenidos al orden del número de menor precisión, de manera que, por ejemplo, en el caso de la espectroscopía de masas en tándem en la que el patrón de D-piroglutamil-L-fenilalanina se infunde directamente a la fuente de ionización electrospray (ESI) y se controlan transiciones de ion padre a ion hijo, se dice que se verifica la presencia en la muestra de suero del bovino de un ion de  $m/z$  277 como ion característico de ESI(+) y la aparición de al menos tres iones hijos de valores de  $m/z$  120, 166 y 231.

También se observan diferencias en el tiempo de retención del dipéptido obtenido en uno y otro ensayo, lo que no es sorprendente porque el cromatógrafo no era el mismo y las condiciones, por ejemplo, de temperatura, tampoco. Por esta razón, puede observarse entre uno y otro ensayo diferencias en las cifras decimales con las que se indica el valor  $m/z$  de los iones analizados, así como en los tiempos de retención. Este tipo de variaciones pueden observarse con frecuencia incluso entre laboratorios, usando el mismo aparato, o si se vuelve a inyectar la sustancia pura para optimizar el método. Por ello, es conveniente llevar a cabo el ensayo con un patrón de D-piroglutamil-L-fenilalanina, que ayude a confirmar la presencia de dicho dipéptido en el suero de un bovino a partir de los resultados obtenidos al analizar dicho suero.

Los ensayos descritos en el Ejemplo 1 de la presente solicitud, confirmados en el Ejemplo 3, demuestran que la determinación del dipéptido D-Pyr-L-Phe es válida para detectar a partir de suero la administración exógena no sólo de  $17\beta$ -estradiol, sino de un éster del mismo, tal como demuestran los ensayos realizados con benzoato de estradiol. El estudio estadístico reflejado en el Ejemplo 1 demuestra también que el análisis del suero puede servir para distinguir las muestras provenientes de animales tratados del  $17\beta$ -estradiol de los animales tratados con benzoato de estradiol.

La invención se explicará ahora con mayor detalle por medio de los siguientes Ejemplos y Figuras.

### EJEMPLOS

Los Ejemplos expuestos en la presente solicitud se llevaron a cabo utilizando los siguientes productos, materiales y técnicas metodológicas:

#### - Muestras de suero, animales y tratamiento de los mismos

Las muestras de suero se obtuvieron de vacas *Holstein* entre 24 meses y 5 años de edad en fase productiva, todas ellas de la misma granja lechera. Los animales se alimentaban con una dieta típica de ganadería lechera y acceso *ad libitum* al agua de bebida. Se utilizaron 48 animales, sometidos a los siguientes tratamientos:

a) Grupo EB: Ocho vacas se trataron con una inyección intramuscular (5 mL) de un medicamento veterinario (Neonida N de Pfizer S.A., Madrid, España) que contenía 1.250 U.I. (unidades internacionales) de gonadotropina coriónica y 5 mg de benzoato de estradiol (EB).

b) Grupo E2: Ocho vacas se trataron con una inyección intramuscular (5 mL) de un estrógeno vitaminado (Estrógeno Vitaminado de Laboratorios IVEN, Madrid, España) conteniendo 2 mg de  $17\beta$ -estradiol y 8 mg de vitamina E.

c) Grupo EB-P4: Ocho animales se trataron con una espiral intravaginal liberadora de progesterona (1,55 g de progesterona dispersos en una matriz elastomérica de silicona) de uso veterinario, con una cápsula adherida a la espiral con 10 mg de EB (PRID® de CEVA Salud Animal, Barcelona, España).

d) Grupo P4: Ocho vacas se trataron con una espiral intravaginal únicamente liberadora de progesterona (sin la cápsula de EB), a fin de chequear la ausencia del biomarcador de estradiol exógeno en el suero de estos animales.

e) Grupo P4-PG: Ocho vacas se trataron con una espiral intravaginal únicamente liberadora de progesterona y una inyección intramuscular de prostaglandina  $F2\alpha$  (500  $\mu$ g de  $PGF2\alpha$ ).

f) Grupo C: Además, se seleccionaron ocho animales para ser usados como grupo control, sanos y que no estaban siendo tratados con medicación veterinaria de ningún tipo.

Las muestras de los animales tratados con EB intramuscular, estradiol intramuscular y con espirales intravaginales (con o sin EB) se recogieron a los 3, 3 y 6 días postadministración, respectivamente. Todas las muestras correspondientes a animales tratados con progesterona se recogieron 8 días después de la administración.

Tras la coagulación sanguínea y su centrifugado a 6000 rpm, se separó el suero del coágulo y las muestras se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### - Procesado de las muestras de suero para el análisis

Las muestras de suero son descongeladas a temperatura ambiente y homogeneizadas. Posteriormente, una cantidad de 100  $\mu$ L de suero se filtra en filtros tipo eppendorf para centrifuga, con un tamaño de poro con un punto de corte a 10 kDa, a 9000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Los filtrados (60  $\mu$ L) se mezclan con 20  $\mu$ L de etanol y se agitan. Después de eso, 10  $\mu$ L de cada muestra se inyectan en el sistema cromatográfico.

Este procesamiento se utilizó tanto para las muestras analizadas en los ensayos de identificación del biomarcador como en los de confirmación de la presencia de D-Pyr-L-Phe en el suero de los animales tratados con estradiol.

- Sustancias de referencia

Las sustancias de referencia incluían metiltestosterona (4-androsteno-17 $\alpha$  metil-17 $\beta$ -ol-3-ona), medroxiprogesterona acetato (4-pregnen-6 $\alpha$ -metil-17-ol-3,20-diona acetato), triamcinolona (1,4-pregnadien-9 $\alpha$ -fluoro-11 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17,21-tetrol-3,20-diona), ponasterona A y estanolozolol (5 $\alpha$ -androstan-17 $\alpha$ -metil-17 $\beta$ -ol-3,2c-pirazol), todas ellas adquiridas a Steraloids Ltd. (Croydon, Reino Unido).

El ácido acético y el acetonitrilo de grado analítico se adquirieron a Solvent Documentation Synthesis (SDS, Peypin, Francia).

El agua se obtuvo mediante el sistema de agua ultrapura Nanopure de Barnstead/Thermolyne (Thermo Scientific, Alemania).

- HPLC-MS

En los ensayos iniciales de identificación de posibles moléculas marcadoras y dilucidación de la estructura del compuesto identificado mediante las mismas, la separación se realizó en un sistema Agilent Serie 1200 HPLC que consta de un muestreador automático refrigerado (6 °C), un desgasificador y una bomba cuaternaria de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania), junto con un espectrómetro de masas híbrido Finnigan LTQ-Orbitrap de Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania). El nitrógeno fue producido por un generador de nitrógeno Mistral-4 de Schmidlin-DBS AG (Neuheim, Suiza).

Por su parte, en los ensayos destinados a confirmar la presencia de D-piroglutamil-L-fenilalanina en el suero de los animales tratados con estradiol, el sistema HPLC consistió en una bomba cuaternaria, desgasificador y muestreador automático de Agilent Technologies modelo 1100, (Minnesota, EE.UU.). Se utilizó un espectrómetro de masas Q-Trap 2000 con fuente de iones Turbo Spray de Applied Biosystems MSD Sciex (Toronto, Canadá). El nitrógeno se obtuvo de un generador de nitrógeno de alta pureza (PEAK Scientific Instruments Ltd, Chicago, Ill). El nitrógeno se utilizó para los gases cortina, nebulizador y de colisión. Este sistema es menos preciso que el anterior y no proporciona cifras decimales en los valores de  $m/z$ .

Las condiciones cromatográficas (fase móvil y gradiente) y la columna fueron los mismos en todos los ensayos. Para la separación cromatográfica se empleó una columna Uptisphere HDO C18 (150 mm x 2,1 mm, tamaño de las partículas 3  $\mu$ m; Interchim, Montluçon, Francia), equipada con una precolumna C18. La fase móvil fue agua (A), mezclada en modo de gradiente con acetonitrilo (B), ambos solventes con ácido acético al 0,1%, con un caudal de 200  $\mu$ l  $\text{min}^{-1}$ . La temperatura de las columnas se mantuvo a 37 °C. El gradiente de elución de la cromatografía fue A: B (v / v): de 100:0 a 90:10 en 5 minutos, de 90:10 a 50:50 en 10 minutos, de 50:50 a 0:100 en 10 minutos y se mantuvo isocrático durante 5 minutos, luego de 0:100 a 100:0 en 5 min y se mantuvo isocrático de nuevo durante 15 min.

El sistema HPLC se conectó a la fuente de ionización electrospray (ESI), que funciona en modo positivo. El voltaje del spray se estableció en 5 kV y la temperatura de la calefacción de transferencia capilar fue de 350 °C. Para ayudar a la evaporación del disolvente, se aplicaron gas nitrógeno vaina y auxiliar a un caudal de 40 y 6 unidades arbitrarias, respectivamente.

En el caso de los ensayos de identificación de posibles moléculas marcadoras, los espectros se adquirieron dentro del intervalo  $m/z$  (relación masa/carga) 50-800, a una resolución de 30.000  $M/\Delta M$  en FWHM, en modo centroide. Por su parte, en los ensayos de elucidación estructural del péptido, la espectrometría de masas de alta resolución (100.000  $M/\Delta M$ ) fue adquirida en el rango de masas de 275-280  $m/z$ .

Los datos se recogieron a través del paquete de software Xcalibur® 2.0.5 (Thermo Fisher Scientific, Alemania).

- Procesamiento y análisis de datos

El paquete de software Xcalibur® se utilizó para convertir el formato original de los datos en un formato más común, \*.cdf. En el caso de los ensayos de identificación del péptido marcador, se utilizó el software XCMS de dicho paquete para comparar los diferentes grupos de muestras, con los siguientes parámetros: el intervalo del valor  $m/z$  para la detección de picos fue el valor por defecto, 0,1; el umbral de la relación de señal respecto al ruido fue 6; la anchura de la banda de grupo fue 10, y la fracción mínima requerido para formar un grupo fue 0,95. Se generó un informe final mostrando los metabolitos estadísticamente más significativos (valor  $p$ ) entre los animales tratados y no tratados, en términos de un juego de metabolitos comunes seleccionados, así como el respectivo cromatograma de iones extraídos para cada uno de los primeros 500 picos estadísticamente más relevantes. Las tablas de los datos finales se importaron a hojas de Excel, consistentes en una tabla de datos bidimensional en la cual las filas y las columnas representan respectivamente las muestras analizadas y las áreas relativas de los picos de cada señal de espectrometría de masas detectada (es decir, un ion con un  $m/z$  y un tiempo de retención dados).

Se llevaron a cabo análisis estadísticos multivariable (análisis de componentes principales (PCA), mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS) y análisis discriminatorio de proyecciones ortogonales a estructuras

latentes (OPLS-DA)) utilizando el programa SIMCA-P+ 12.0 (Umetrics AB, Suecia). Para todos los análisis, los datos se sometieron a transformación logarítmica y se escalaron de acuerdo con el método Pareto. En primer lugar se aplicó PCA para tener una visualización no supervisada de los resultados, utilizando OPLS en segundo lugar para construir modelos descriptivos y predictivos más robustos y eficientes. El análisis de regresión multivariable en términos de análisis discriminatorio de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) se aplicó para extraer la variación sistemática en los perfiles de cuantificación de suero (matriz X) relativos a la respuesta (y o z) y revelar la separación de clases. En este caso, la respuesta y es un vector arbitrario que describe el estatus del animal (es decir, control o tratado), y la respuesta z es el vector que describe los diferentes tipos de tratamientos hormonales. Al comparar el grupo de animales tratados frente al grupo de controles, el vector y tomaba los valores 1 = control y 2 = tratado, y el vector z era 1 = C, 2 = E2, 3 = EB y 4 = EB-P4. La calidad de los modelos OPLS finalmente obtenidos se controló mediante tres parámetros:  $R^2(X)$ , el porcentaje de la varianza total de las variables dependientes explicadas por el modelo;  $R^2(Y)$ , la proporción de la varianza total de la respuesta variable (y o z) explicada por el modelo, y  $Q^2(Y)$ , similar a  $R^2(Y)$  pero sometida a validación cruzada. La robustez del modelo descriptivo OPLS se evaluó estableciendo un modelo predictivo para cada caso, en el que se utilizaron 2/3 de los datos (y o z conocidos) para predecir el restante 1/3 de los datos (y o z desconocidos).

#### - Material para la síntesis de D-piroglutamil-L-fenilalanina

Los reactivos empleados para la síntesis del péptido incluyen: ácido D-piroglutámico, L-fenilalanina metil éster clorhidrato, hexafluorofosfato benzotriazolilo tetrametilurionium (HBTU) y diisopropiletilamina (DIPEA) de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etilo, bisulfato potásico ( $\text{KHSO}_4$ ), bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), sulfato magnésico ( $\text{MgSO}_4$ ), tetrahidrofurano (THF), hidróxido de bario ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ), ácido clorhídrico 1N (HCl) de Merck (Darmstadt, Alemania). También agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA). Todos los reactivos de grado analítico.

#### - Ejemplo 1 : Identificación de candidatos a compuestos biomarcadores

La identificación de posibles compuestos candidatos a biomarcadores del tratamiento con  $17\beta$ -estradiol o un éster del mismo se llevó a cabo comparando los sueros de los diferentes grupos de animales (EB, E2, EB-P4, P4 y C), tras someterlos a separación cromatográfica (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

Para controlar el procedimiento, a cada muestra de suero filtrado (60  $\mu\text{L}$ ) se le añadió una solución (20  $\mu\text{L}$ ) con un estándar interno (metiltestosterona, medroxiprogesterona acetato, triamcinolona, ponasterona A y estanozolol en etanol a una concentración de 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). El estándar interno consistía en compuestos de naturaleza esteroide pero sintéticos, de manera que no podían estar presentes en las muestras de suero antes de haber sido añadidos, y que poseían unos valores de  $m/z$  y tiempo de retención (RT) previamente conocidos. Ello permitió monitorizar y controlar varios parámetros analíticos durante cada secuencia de inyección, incluidos el tiempo de retención, la abundancia de la señal y la calibración de las masas. Una vez bien mezclados los filtrados con el estándar interno, se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra obtenida en el sistema cromatográfico y se comenzó el proceso.

La simple comparación visual de los cromatogramas obtenidos de los animales control y los animales que habían sido sometidos a algún tipo de tratamiento no permitió identificar diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, el procesamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos sí permitió observar diferencias.

Mediante el software XCMS, se obtuvo una lista de metabolitos (potenciales biomarcadores) clasificados de acuerdo con su valor  $p$ , es decir, el nivel de confianza asociado a la diferencia en abundancia observada entre los dos grupos de muestras a comparar (controles frente a animales sometidos a algún tipo de tratamiento). Siguiendo el criterio habitual, los iones que presentaban un valor  $p$  por debajo de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos, con un nivel de confianza del 95%. La observación de la tabla obtenida con XCMS permitió observar buenos valores  $p$  para los iones que posteriormente resultaron relevantes al efectuar el análisis multivariable.

#### 1.1. Análisis estadístico descriptivo multivariable

Mediante el software XCMS se generaron dos grupos de datos, seleccionándose en ambos casos los metabolitos con valores  $p$  inferiores a 0,05. El primer juego de datos correspondía a una matriz de 232 columnas (picos o metabolitos) y 32 filas (animales experimentales), que se obtuvo de la comparación de los animales control (C) frente a los animales que habían recibido estradiol o benzoato de estradiol (grupos EB, E2 y EB-P4). El segundo juego de datos correspondía a la comparación de animales que habían recibido tratamiento con progesterona (EB-P4, P4 y P4-PG), frente al grupo control. De esta manera, la matriz de datos representa el área bajo el perfil cromatográfico cuando se compara cada grupo de animales tratados con el grupo control. El juego de datos generado mediante XCMS y procesado mediante SIMCA+P era una matriz de metabolitos o variables X y animales experimentales. Se añadieron dos columnas adicionales para llevar a cabo OPLS, que representaban variables Y (animales control frente a animales tratados [y] y animales control frente a los diferentes tratamientos [z]).

La representación de los valores obtenidos mediante el análisis PCA (véase la Fig. 1) permitió observar diferencias significativas entre los animales control y los animales sometidos a algún tipo de tratamiento hormonal, e incluso agruparlos según el tratamiento específico recibido, puesto que el grupo de animales tratados con  $17\beta$ -

estradiol (E2) se distingue claramente del grupo tratado con benzoato de estradiol (EB), obteniéndose un valor de  $R^2(X)$  de 0,92 para el primer componente principal. También es posible observar el agrupamiento de los tratamientos con progesterona y el grupo control, obteniéndose un  $R^2(X)$  de 0,87 para el primer componente principal. El  $R^2(X)$  representa el porcentaje de variación descrito en los datos mediante un componente principal.

5 Los modelos de OPLS proporcionaron valores elevados de  $R^2(Y)$  en ambos estudios, utilizando o el vector y o el vector z: 0,98 (y) y 0,97 (z) para el modelo referido a animales tratados con estradiol o benzoato de estradiol, y 0,98 (y) y 0,99 (z) para el modelo referido a animales tratados con progesterona. Los valores de  $Q^2(Y)$  sugieren que los modelos pueden utilizarse como predictores de futuros datos desconocidos, proporcionando valores superiores a 0,90 en cada modelo OPLS.

10 Previamente, se había llevado a cabo un ensayo con las ocho muestras EB-P4 incluidas en el grupo de animales tratados con estradiol o con un éster del mismo (animales control frente a todos los tratamientos agrupados en el mismo grupo), tratando de distinguir ambos tipos de tratamientos (con estradiol o un éster del mismo y progesterona) de los animales control. Sin embargo, estas muestras correspondientes a animales tratados con progesterona aparecían mezcladas con los animales control durante el análisis multivariable y sólo las muestras correspondientes al tratamiento EB-P4 pudieron ser clasificadas como "tratadas" utilizando el perfil metabólico obtenido. Basándose en este estudio previo, y teniendo en cuenta que los tratamientos hormonales en los que participaban el estradiol o su éster se podían distinguir correctamente, se decidió llevar a cabo un procesamiento independiente de los datos correspondientes a muestras de animales tratados con progesterona frente a las muestras de animales control. Este nuevo estudio se llevó a cabo sin muestras EB-P4 porque el estradiol ocultaría el efecto de la progesterona para obtener potenciales biomarcadores para los tratamientos con esta segunda hormona, como ya se había observado durante el ensayo previo.

### 1.2. Análisis estadístico predictivo multivariable

25 El análisis estadístico predictivo multivariable se llevó a cabo, en estudios independientes, tanto para los animales sometidos a tratamiento con estradiol o benzoato de estradiol como para los animales tratados con progesterona. A continuación se describen los resultados obtenidos con el primer grupo: tratamiento con estradiol o benzoato de estradiol.

30 Los datos previamente obtenidos se dividieron en dos grupos, eligiendo al azar 2/3 de los datos correspondientes a animales experimentales (21 animales de entre aquellos tratados con estradiol o benzoato de estradiol) para que compusieran el juego predictivo, y 1/3 fueron utilizados como juego de validación independiente para ver si el primer juego podía predecir el grupo al que pertenecían. Las características de los modelos OPLS-DA predictivos obtenidos fueron las siguientes:  $R^2(X) = 0,75$ ,  $R^2(Y) = 0,99$  y  $Q^2(Y) = 0,98$  trabajando con el vector y, y  $R^2(X) = 0,87$ ,  $R^2(Y) = 0,96$  y  $Q^2(Y) = 0,83$  trabajando con el vector z. Las muestras independientes se representaron gráficamente de la siguiente manera: 3 = control, 4 = tratada (y), y 5 = control, 6 = grupo E2, 7 = grupo EB, 8 = grupo EB-P4 (z).

35 En el juego de muestras independientes, cada una de ellas fue asignada correctamente al grupo de control o de muestra tratada mediante el modelo OPLS del juego predictor, tal como se puede ver en las representaciones gráficas de los valores T obtenidos (véase la Fig. 2). Ninguna de estas muestras independientes resultó clasificada de forma incorrecta.

### 1.3. Selección de potenciales biomarcadores

40 La selección de potenciales biomarcadores se llevó a cabo basándose en el análisis OPLS. Para ello, se obtuvieron las representaciones gráficas resultantes de la aplicación del análisis OPLS-DA. Estos gráficos revelan a contribución de cada variable al componente predictivo y hacen posible que destaquen las variables que presentan mayor correlación con el eje en el análisis OPLS y que son los potenciales biomarcadores más relevantes: los metabolitos que aparecen en dicho gráfico muy distantes del centro pueden seleccionarse como candidatos a biomarcadores. Varios iones parecían ser buenos candidatos a biomarcadores, por lo que se sometieron a un estudio adicional. Este trabajo consistió en visualizar cromatogramas y gráficos generados mediante el software XCMS, para confirmar que los correspondientes picos tenían una buena forma, observar su abundancia y confirmar que había variaciones entre las muestras. Finalmente, se seleccionaron siete iones como buenos biomarcadores potenciales. La Fig. 3 muestra la abundancia media de cada uno de estos candidatos a biomarcadores, tanto en las muestras control como en las muestras provenientes de animales tratados con estradiol o con benzoato de estradiol. La Tabla 1 que se muestra a continuación indica el tiempo de retención de cada uno de estos iones, así como la relación de la abundancia (intensidad del ion) de los mismos entre los animales control y los animales sometidos a tratamiento con  $17\beta$ -estradiol o benzoato de estradiol.

Tabla 1: Iones candidatos a biomarcadores del tratamiento con estradiol

| Identificador<br>(ID) | [M+H] <sup>+</sup> | Tiempo de retención<br>(RT)<br>(minutos) | Relación de intensidad entre<br>animales no tratados y tratados |
|-----------------------|--------------------|--|---|
| M393T879              | 393,210            | 14,65                                    | 7,18  |
| M277T968              | 277,118            | 16,18                                    | 0,08  |
| M453T899              | 453,212            | 14,97                                    | 9,39  |
| M497T916              | 497,236            | 15,27                                    | 15,10   |
| M384T998              | 384,233            | 16,60                                    | 87,99   |
| M541T931              | 541,260            | 15,53                                    | 8,08  |
| M585T945              | 585,288            | 15,76                                    | 37,33   |

Sólo un ion parece ser característico del suero de los animales tratados con estradiol (o benzoato de estradiol): M277T968, con una relación de intensidad de 0,08 en el suero de animales no tratados respecto al suero de animales tratados.

5 Por ello, se continuó el estudio con este ion, para dilucidar su estructura química y confirmar su potencial como biomarcador del suero de los animales tratados con estradiol.

**- Ejemplo 2: Dilucidación estructural de un biomarcador potencial de tratamientos con 17β-estradiol exógeno en el ganado**

2.1. Elucidación estructural del péptido: patrón de fragmentación obtenido mediante HPLC-MS<sup>n</sup>

10 Una vez comprobado que el candidato a biomarcador preseleccionado estaba presente en las muestras de los animales tratados con benzoato de estradiol (panel A de la Fig. 4), mientras que su intensidad en las muestras control era bastante baja (panel B de la Fig. 4), se procedió a dilucidar la estructura química del candidato a biomarcador.

15 La dilucidación estructural de metabolitos se realiza por la adquisición de nuevos datos de la molécula fragmentándola mediante espectrometría de masas en tándem.

20 Se llevaron a cabo experimentos de fragmentación empleando para ello las mismas condiciones analíticas (cromatografía líquida y espectrometría de masas) que en los experimentos de identificación del biomarcador potencial descritos en el Ejemplo 1. Todo ello con el fin de obtener información estructural de la molécula a través de la interpretación del patrón de fragmentación del candidato a biomarcador ( $m/z$  277, tiempo de retención de 968 segundos).

25 La transición del catión molecular  $m/z$  277 a los fragmentos específicos mediante fragmentación en el espectrómetro de masas dio como resultado la formación de los siguientes iones diagnóstico dominantes:  $m/z$  231,  $m/z$  166,  $m/z$  259 y  $m/z$  120 (Fig. 5). Por otra parte, la espectrometría de masas de alta resolución (100.000 M /  $\Delta M$  en FWHM) fue adquirida en un rango de masas de 275-280  $m/z$ , de modo que se obtuvo la masa del ión con precisión (Fig. 6). Los datos fueron recolectados a través del paquete de software Xcalibur 2.0.5 (Thermo Fisher Scientific).

30 Una vez seleccionado el potencial biomarcador, es necesario identificarlos con precisión. Las bases de datos existentes, como KEGG, METLIN o PubChem, incluyen datos como la masa exacta, la composición elemental, o datos MS/MS, para varios metabolitos conocidos. Estas bases de datos de metabolitos son un buen punto de partida para evaluar los datos de espectrometría de masas, pero su utilidad está limitada porque están incompletas. Por lo tanto, incluso tras haber obtenido el patrón de fragmentación, fue necesario realizar esfuerzos en la investigación bibliográfica con el fin de encontrar algún informe anterior de este biomarcador potencial. Basándose en su patrón de fragmentación, un buen candidato para ser el biomarcador  $m/z$  277 fue encontrado en un artículo de Sforza *et al.* publicado en 2009 (Sforza *et al.*, 2009): D-piroglutamil-L-fenilalanina (D-Pyr-L-Phe). Es por ello que fue  
35 sometido a una mayor investigación.

**- Ejemplo 3: Confirmación de la identidad como D-Pyr-L-Phe del posible biomarcador**3.1. Síntesis de D-Pyr-L-Phe

Para confirmar la identidad del metabolito y generar un patrón para la futura validación cuantitativa del biomarcador se hace necesaria la síntesis de un estándar estable como paso final de la elucidación. A su vez, esto permitió posteriormente confirmar la correspondencia entre el péptido seleccionado (reportado por Sforza *et al.* en 2009) y el biomarcador putativo de los tratamientos de estradiol en ganado bovino ( $m/z$  277). El dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina (D-Pyr-L-Phe) se sintetizó siguiendo una versión simplificada del procedimiento descrito anteriormente por Sforza *et al.* (Sforza *et al.*, 2009).

El péptido D-piroglutamil-L-fenilalanina se sintetizó a partir de 0,78 g (6 mmol) de ácido D-piroglutámico disuelto en 20 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , junto con 2,16 g (5,7 mmol) de HBTU. La mezcla se mantuvo en agitación continua a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego 1,3 g (6 mmol) de L-fenilalanina metil éster clorhidrato se disolvieron en 8 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  con 2,96 mL (18 mmol) de DIPEA, y se añadió el ácido piroglutámico (previamente activado). La reacción se llevó a cabo bajo agitación magnética durante 5 horas a temperatura ambiente y controlada por TLC (eluyente: acetato de etilo; detector de absorbancia UV, Rf de 0,65). La solución se lavó con una solución saturada de  $\text{KHSO}_4$  y  $\text{NaHCO}_3$ , se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se filtró. Después de secar el producto al vacío, el grupo metilo se eliminó mediante la disolución del éster en 50 ml de THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v / v) y la adición de 2 equivalentes de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (12 mmol, 3,78 g), reaccionando durante 20 minutos un 0 °C. El THF se eliminó al vacío y la solución se acidificó con HCl (pH 3,0). El producto precipitado se separó por centrifugación y secado al vacío, con un rendimiento del 60%.

3.2. Confirmación de la identidad del candidato a biomarcador: Adecuación del método de HPLC-MS/MS

Para confirmar la presencia de D-Pyr-L-Phe en el suero de los animales tratados con estradiol, usando el estándar de la síntesis, se adaptó el método de HPLC-MS/MS utilizado inicialmente para la identificación del biomarcador, con la intención de que pudiera ser empleado en el análisis de futuras muestras en las que se deseara confirmar la presencia de D-Pyr-L-Phe.

El sistema HPLC consiste en una bomba cuaternaria, desgasificador y muestreador automático de Agilent Technologies modelo 1100 (Minnesota, EE.UU.). Se utilizó un espectrómetro de masas Q-Trap 2000 con fuente de iones Turbo Spray de Applied Biosystems MSD Sciex (Toronto, Canadá). El nitrógeno se obtiene de un generador de nitrógeno de alta pureza (PEAK Scientific Instruments Ltd, Chicago, Ill). El nitrógeno se utiliza para los gases cortina, nebulizador y de colisión.

Las condiciones cromatográficas (fase móvil y gradiente) y la columna son los mismos que en el Ejemplo 1 de la investigación del descubrimiento. Por tanto, se utilizó una columna Uptisphere HDO C18 (150 mm x 2,1 mm, tamaño de las partículas 3  $\mu\text{m}$ ; de Interchim, Montluçon, Francia), equipado con una precolumna también C18, para la separación cromatográfica. La fase móvil fue agua (A), mezclada en modo de gradiente con acetonitrilo (B), ambos con 0,1% de ácido acético, con un caudal de 200  $\mu\text{l min}^{-1}$ . El gradiente de elución de la cromatografía fue A: B (v / v): de 100:0 a 90:10 en 5 minutos, de 90:10 a 50:50 en 10 minutos, de 50:50 a 0:100 en 10 minutos y se mantuvo isocrático durante 5 minutos, luego de 0:100 a 100:0 en 5 min y se mantuvo isocrático de nuevo durante 15 min.

Las condiciones de la espectrometría de masas se optimizaron para conseguir la intensidad máxima de la señal mediante la infusión directa del estándar de D-Pyr-L-Phe en la fuente de ionización electrospray ESI, consistiendo en una solución de metanol/agua (50:50, v/v) con 0,1% de ácido fórmico con una concentración del dipéptido de 1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Los parámetros que dependen de compuesto se optimizaron también y fueron: potencial *declustering*, potencial de entrada, potencial de entrada de la celda de colisión, la energía de colisión, potencial de salida de la celda de colisión. Los valores que se consideraron óptimos y se utilizaron para confirmar la presencia del péptido en muestras reales se indican en la Tabla 2 para cada rango de transición MRM (*multiple reaction monitoring*: monitorización de reacciones múltiples):

**Tabla 2:** Condiciones de espectrometría de masas optimizadas para D-Pyr-L-Phe

| Transición MRM | Energía de Colisión (Voltios) | Potencial de salida de la celda de colisión (Voltios) | Potencial de entrada de la celda de colisión (Voltios) | Potencial de entrada (Voltios) | Potencial Declustering (Voltios) |
|----------------|-------------------------------|---|--|--------------------------------|----------------------------------|
| 276,9 > 119,9  | 37                            | 4   | 18   | 7                              | 41                               |
| 276,9 > 166,1  | 23                            | 2   | 18   | 7                              | 41                               |
| 276,9 > 230,9  | 15                            | 4   | 18   | 7                              | 41                               |

Los parámetros de la fuente ESI se optimizaron para máxima intensidad bajo condiciones de cromatografía, utilizando el modo de inyección en flujo (FIA), obteniendo los siguientes resultados:

- tensión del ionspray, 5000 V,
- temperatura del calentador, 350 ° C,
- 5 - gas cortina, 25 unidades arbitrarias (UA),
- gas colisión, medio, gas nebulizador, 40 UA, y
- gas turbo, 60 UA.

Tres transiciones MRM (ión padre > ión hijo o fragmento) fueron controladas, con 150 ms de tiempo de permanencia en celda para cada una de ellas.

### 10 3.3. Confirmación de la identidad del candidato a biomarcador: Confirmación de sus características y de su presencia en muestras reales.

Una vez sintetizado el dipéptido D-Pyr-L-Phe, se procedió a comprobar su presencia en muestras reales.

15 Una solución de D-Pyr-L-Phe en metanol: agua (50/50, v/v) y 0,1% de ácido fórmico, a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup>, se infundió en la fuente de ESI en modo positivo. El ion característico encontrado en ESI (+) para este dipéptido estaba en *m/z* 277. Los iones o fragmentos correspondientes a Pyr-Phe se obtuvieron a *m/z* 120, *m/z* 166 y *m/z* 231, con lo que la correspondencia estructural con los fragmentos anteriormente obtenidos para el biomarcador en suero fue confirmada. Además, se realizó un dopaje de suero blanco (sin presencia del biomarcador) con la solución estándar del biomarcador D-Pyr-L-Phe, inyectando la mezcla resultante en el sistema cromatográfico y analizándola bajo condiciones HPLC-MS/MS, para comprobar que su tiempo de retención coincidía con el de las muestras de suero de animales tratados con estradiol, obteniéndose efectivamente la correspondencia del tiempo de retención deseado entre el dipéptido sintetizado y el biomarcador putativo (Fig. 7).

20 Las muestras de suero seleccionadas fueron las mismas que las analizadas en el análisis de descubrimiento para que la presencia del dipéptido pudiese ser confirmada (Ejemplo 1), mediante un método HPLC-MS/MS dirigido a la detección de D-Pyr-L-Phe.

25 Las mismas muestras reales que se analizaron en los experimentos del descubrimiento del biomarcador fueron analizadas con la metodología HPLC-MS/MS desarrollada, de manera que la presencia de D-Pyr-L-Phe en el suero de los animales tratados con estradiol y su ausencia en los animales control pudieran ser confirmados.

30 El pico cromatográfico correspondiente al dipéptido se encontró en las muestras de suero de los animales tratados con algún medicamento con estradiol (benzoato de estradiol o 17β-estradiol: paneles A y B, respectivamente, de la Fig. 8), así como su ausencia se confirmó en animales control (panel C de la Fig. 8) y en animales tratados sólo con progesterona (panel D de la Fig. 8). La comparación de los paneles A y B de la Fig. 8 con los paneles C y D indica claramente la diferencia de intensidad entre los picos que, por su tiempo de retención, corresponden al péptido: mientras en los paneles A y B la intensidad del pico es claramente superior a 200 cuentas por segundo (cps) (concretamente, cercana a 280 cps en el panel A y cercana a 240 cps en el panel B), en la muestra correspondiente a animales control la intensidad del pico que aparece en una posición equivalente presenta una altura similar a la de cualquier otro pico (unas 20 cps), siendo superada por otros picos, mientras que en la muestra correspondiente al tratamiento con progesterona sí existe un pico que aparece en un tiempo similar al pico máximo de los paneles A y B, aunque su intensidad corresponde sólo a 33,3 cps.



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

- Altamura, M. R.; Andreotti, Rodolfo; Bazinet, Maurice L.; Long, Louis, Jr. Pyroglutamyl dipeptides in mushroom, *Agaricus campestris*. *Journal of Food Science* (1970), 35(2), 134-9
- Fujiwara K; Kobayashi R; Tsuru D. The substrate specificity of pyrrolidone carboxyl peptidase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *BBA Enzymology*. 12.09.1979. Vol. 570(1).140-148.
- Sforza, S., Cavatorta, V., Galaverna, G.; Dossena, A., Marchelli, R. (2009). Accumulation of non-proteolytic aminoacyl derivatives in Parmigiano-Reggiano cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 19, 582-587
- Regal, P., Anizan, S., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Cepeda, A., Fente, C. (2011). Metabolomic approach based on liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry to screen for the illegal use of estradiol and progesterone in cattle. *Analytica Chimica Acta*, 700, 16-25. (*Selected papers presented at the 6th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis Gent, Belgium, 1-4 June 2010 - HVDA-2010*).
- Scippo M-L, Degand G, Duyckaerts A, Maghuin-Rogister A, Delahaut P. Control of the illegal administration of natural steroid hormones in the plasma of bulls and heifers. *Analyst* 119 (1994), 2639-2644. DOI: 10.1039/AN9941902639
- Simontacchi C, Perez de Altamirano T, Marinelli L, Angeletti R, Gabai G. Plasma steroid variations in bull calves repeatedly treated with testosterone, nortestosterone and oestradiol administered alone or in combination. *Vet. Res. Commun.* 28 (2004) 467-477.
- Stolker AAM, Groot MJ, Lasaroms JJP, Nijrolder AWJM, Blokland MH, Riedmaier I, Becker C, Meyer HHD and Nielen MWF. Detectability of testosterone esters and estradiol benzoate in bovine hair and plasma following pour-on treatment. *Anal Bioanal Chem* 395(4) (2009):1075-87.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la administración exógena de  $17\beta$ -estradiol o un éster del  $17\beta$ -estradiol a animales bovinos que comprende las etapas de:
- a) determinar la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina en una muestra de suero sanguíneo tomada del bovino en estudio;
  - 5 b) comparar dicha concentración con un valor de referencia obtenido de muestras de suero de bovinos control, que no han recibido  $17\beta$ -estradiol o un éster del mismo;
  - c) concluir que ha habido administración exógena de  $17\beta$ -estradiol o un éster del mismo si el incremento de D-piroglutamil-L-fenilalanina en el suero del bovino en estudio respecto al valor de referencia es significativo.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el bovino en estudio y los bovinos control son de la misma especie.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la especie de los bovinos es *Bos taurus*.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el bovino en estudio y los bovinos control son del mismo sexo.
- 15 5. Método según la reivindicación 4, en el que el sexo es el femenino.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el bovino en estudio y los bovinos control están en edad reproductiva.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el bovino en estudio y los bovinos control son vacas.
8. Método según la reivindicación 7, en el que las vacas son de la raza Holstein.
- 20 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de suero sanguíneo se somete a filtración para eliminar proteínas de alto peso molecular antes de determinar la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la determinación de la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina se realiza mediante técnicas de inmunoensayo.
- 25 11. Método según la reivindicación 10, en el que la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina se determina mediante ELISA.
12. Método según la reivindicación 11, en el que se utiliza un anticuerpo primario que reconoce específicamente D-piroglutamil-L-fenilalanina, anticuerpo primario al que se une un anticuerpo secundario al cual está unida la enzima que genera un producto a partir de cuya concentración se determina la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina en la muestra en estudio.
- 30 13. Método según la reivindicación 9, en el que los componentes del suero se separan mediante cromatografía antes de determinar la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina .
14. Método según la reivindicación 13, en el que los componentes del suero se separan mediante cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía de gases de alta resolución.
- 35 15. Método según la reivindicación 14, en el que los componentes del suero se separan mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.
16. Método según la reivindicación 15, en el que se utiliza espectrometría de masas en tándem.
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que se utiliza como patrón el dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina.
- 40 18. Método según la reivindicación 17, en el que la concentración de D-piroglutamil-L-fenilalanina en la muestra se determina a partir de la intensidad de la señal del ion que coincida en relación masa/carga ( $m/z$ ) y tiempo de retención con la correspondiente al patrón de D-piroglutamil-L-fenilalanina.
- 45 19. Método según la reivindicación 18, en el que se utiliza espectroscopía de masas en tándem, en la que el patrón D-piroglutamil-L-fenilalanina se infunde directamente en la fuente de ionización electrospray (ESI) y se controlan transiciones de ion padre a ion hijo, verificando la presencia en la muestra de suero del bovino en estudio de un ion de  $m/z$  277 como ion característico en ESI(+) y la aparición de al menos tres iones hijos de valores de  $m/z$  120, 166 y 231.

## ES 2 378 586 A1

20. Un kit para determinar la administración exógena a animales bovinos de  $17\beta$ -estradiol o un éster del  $17\beta$ -estradiol, caracterizado por que comprende D-piroglutamil-L-fenilalanina.

21. Kit según la reivindicación 20, que comprende adicionalmente un anticuerpo específico para el dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina.

5 22. Kit según la reivindicación 21, que comprende adicionalmente un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo específico para el dipéptido D-piroglutamil-L-fenilalanina.

23. Kit según la reivindicación 21 ó 22, en el que el anticuerpo específico o, de estar presente, el anticuerpo secundario, está unido a una enzima.

10 24. Kit según la reivindicación 23, que adicionalmente comprende un sustrato de la enzima que es transformado por la misma en un producto fácilmente diferenciable del sustrato.

25. Kit según la reivindicación 24, en el que el producto se diferencia del sustrato por su color.

26. Kit según la reivindicación 24, en el que el producto se diferencia del sustrato por emitir luz.

15 27. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, que adicionalmente comprende una solución tampón en la que la enzima es activa o una solución que, tras dilución, da lugar a una solución tampón en la que la enzima es activa.

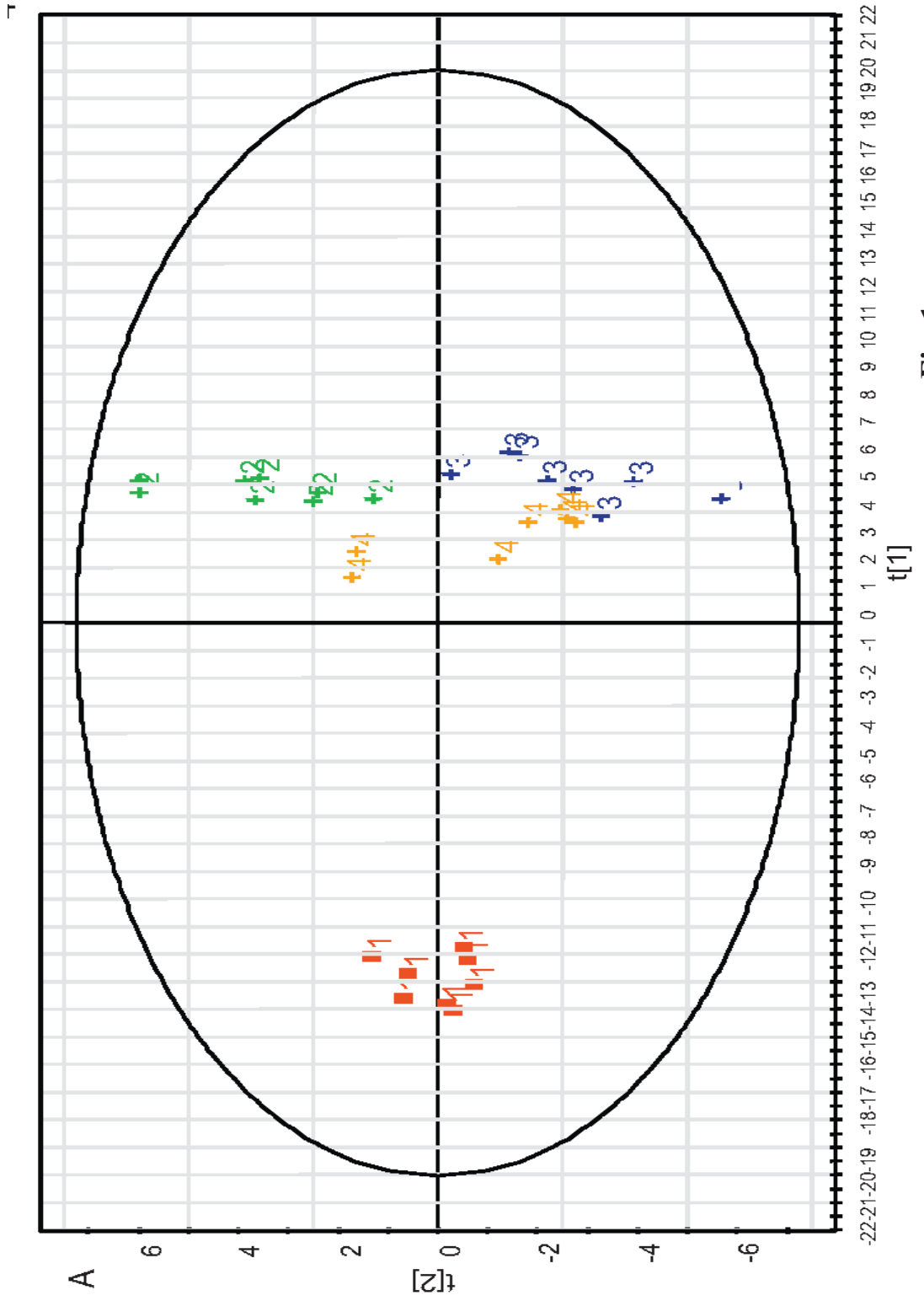


Fig. 1

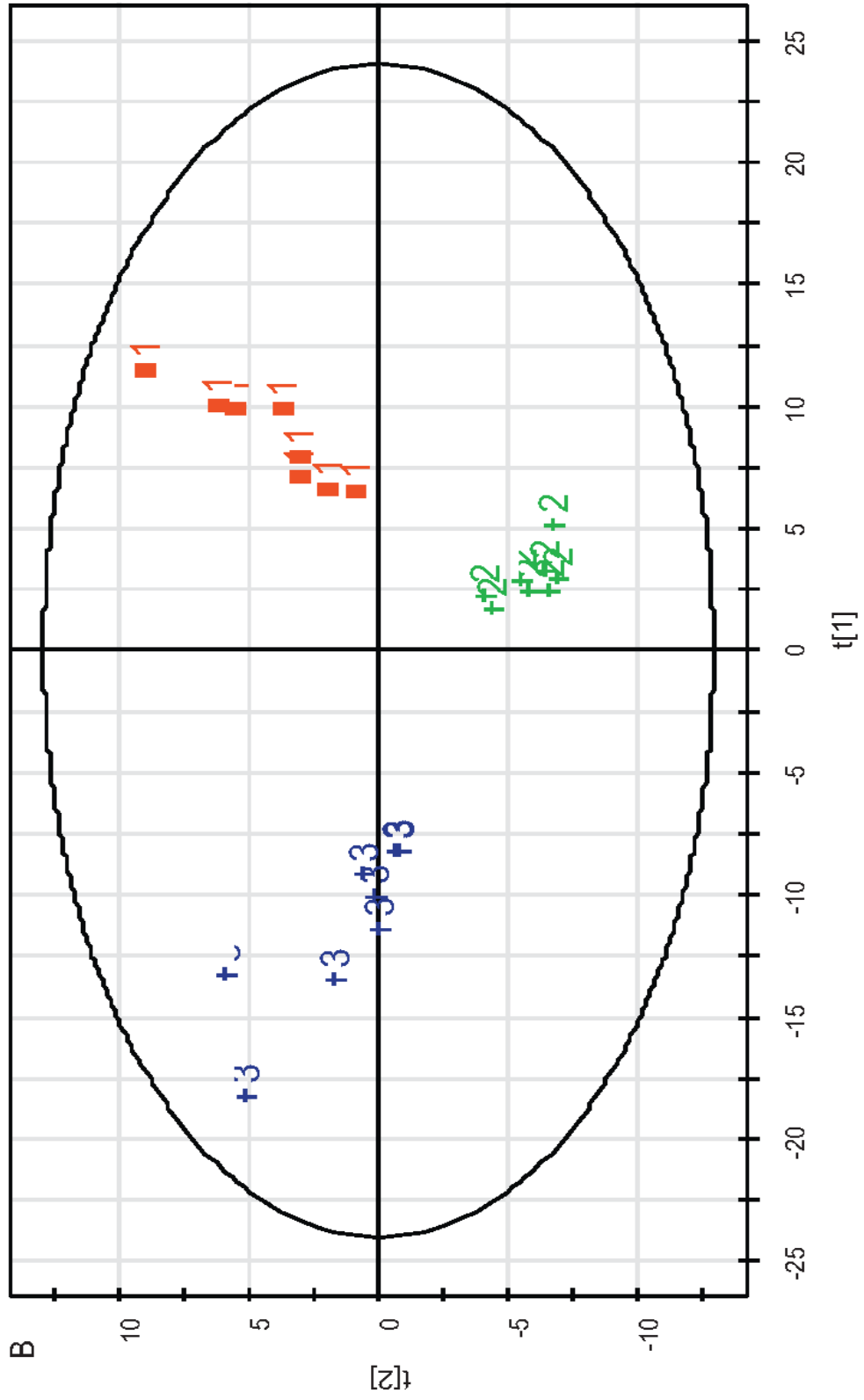


Fig. 1 (cont.)

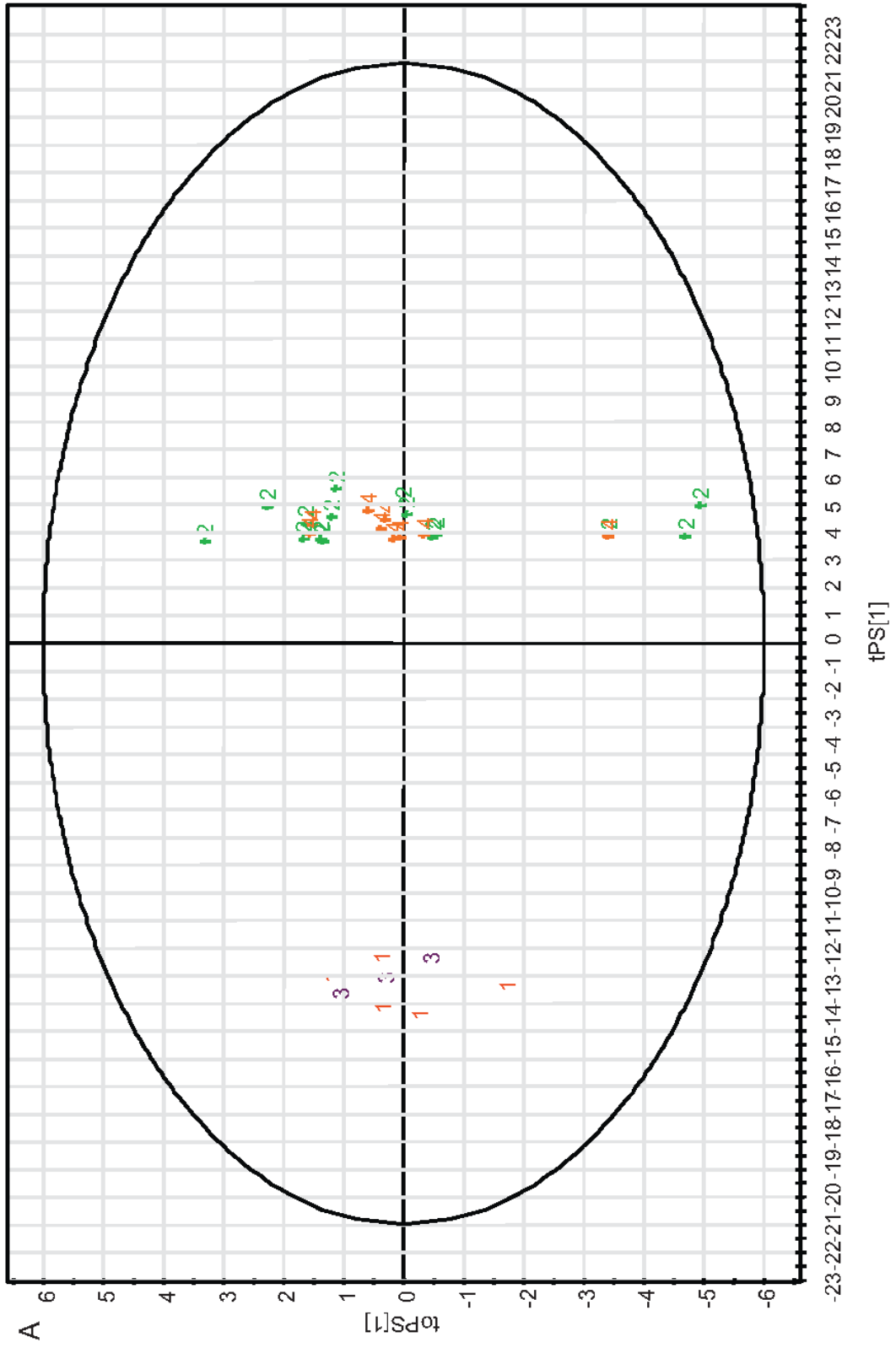


Fig. 2

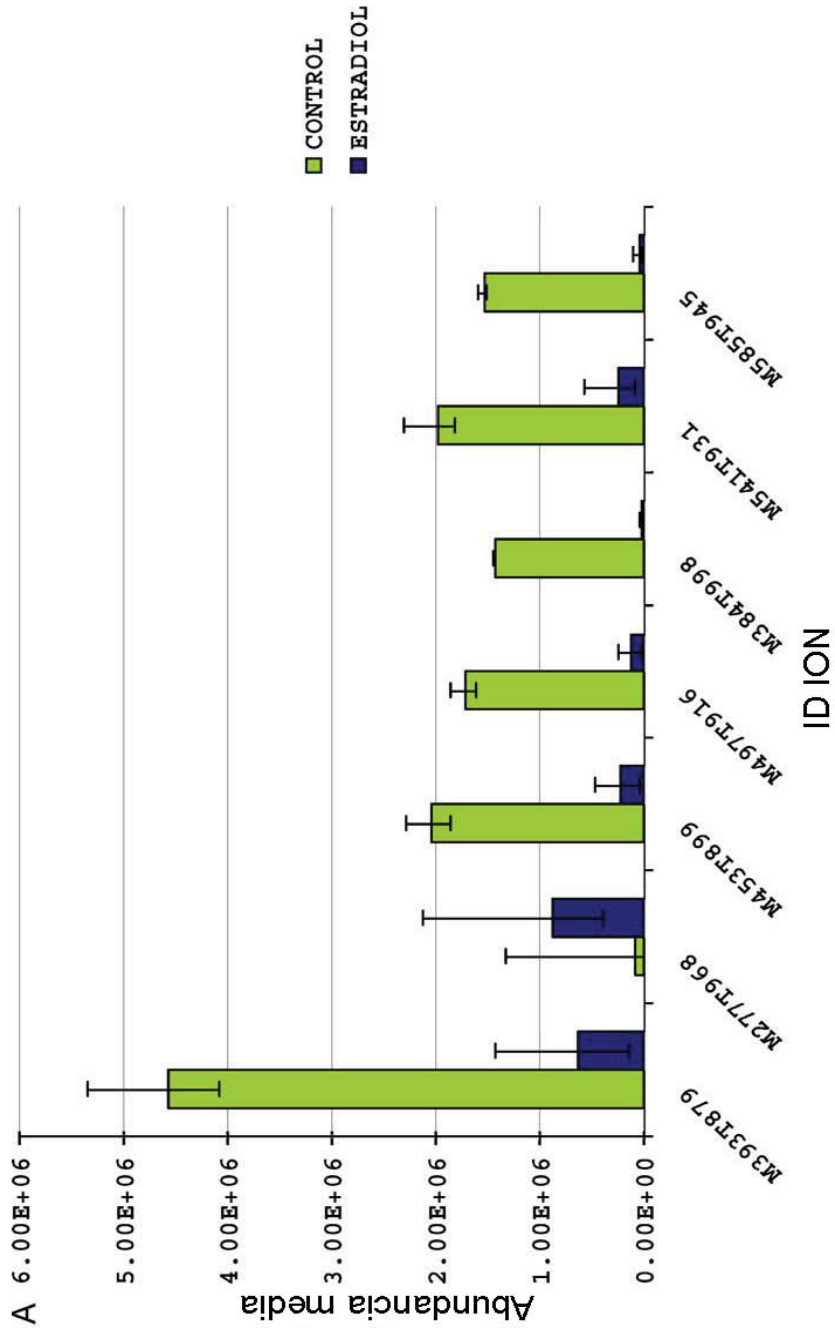


Fig. 3

A

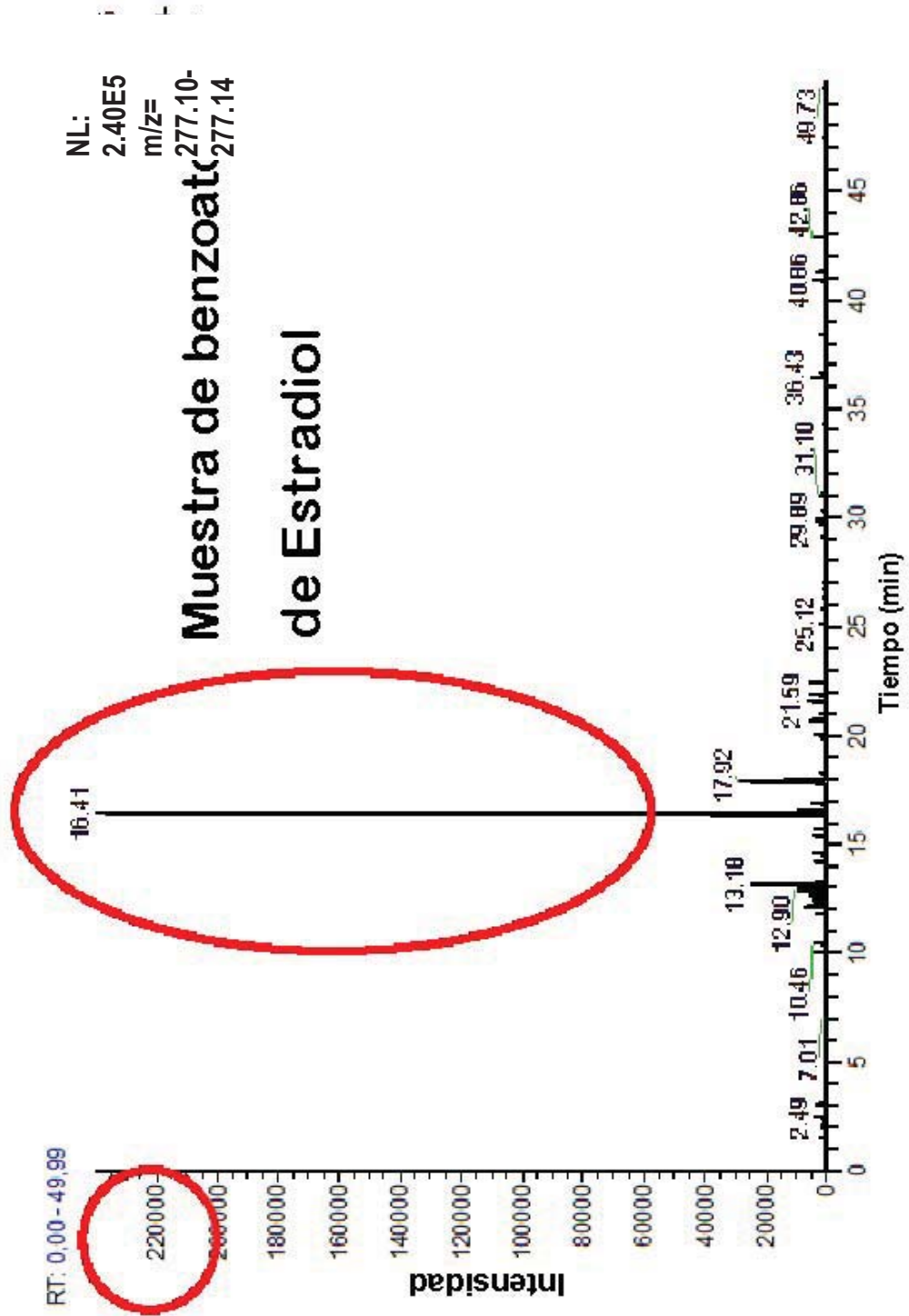


Fig. 4



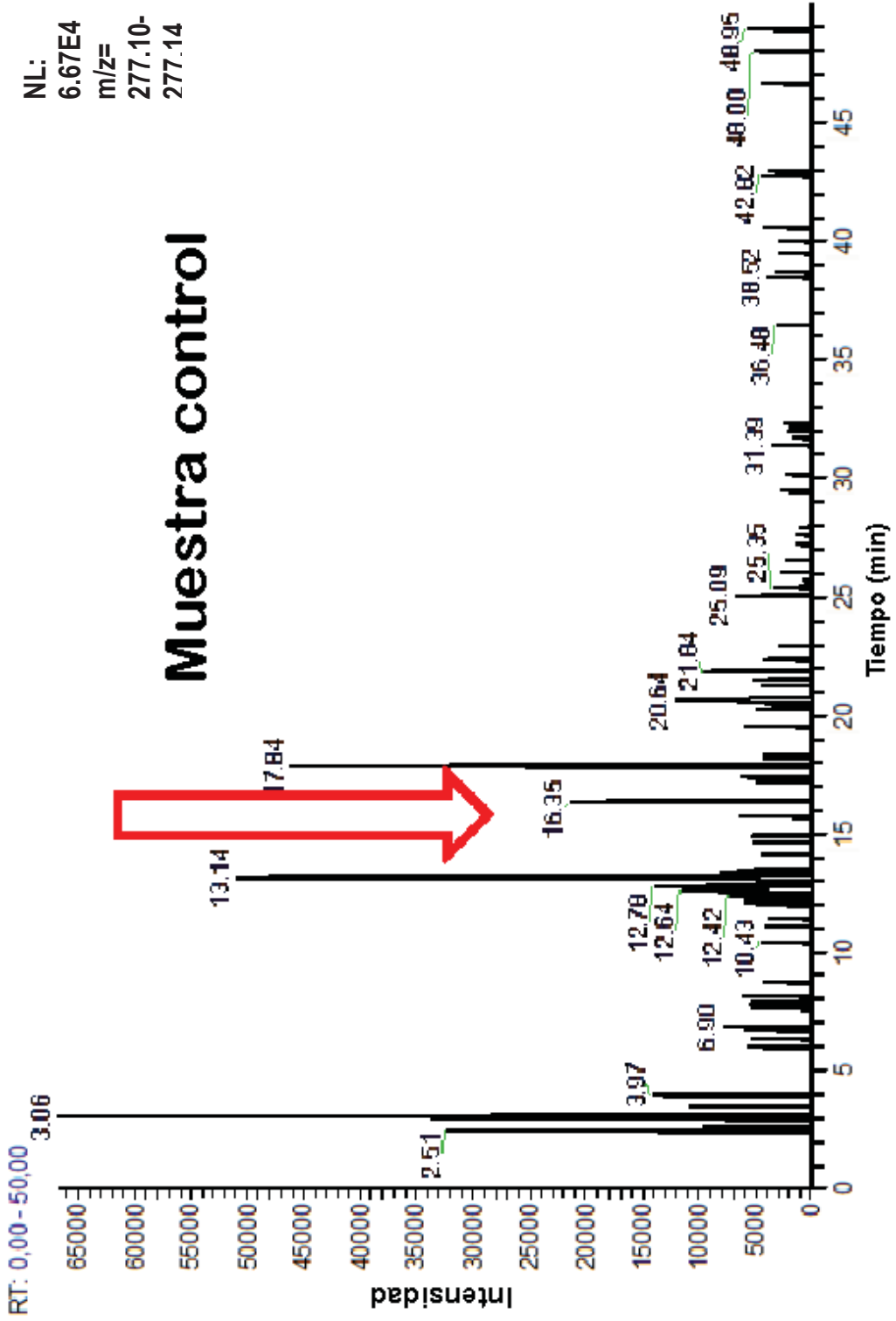


Fig. 4 (cont.)

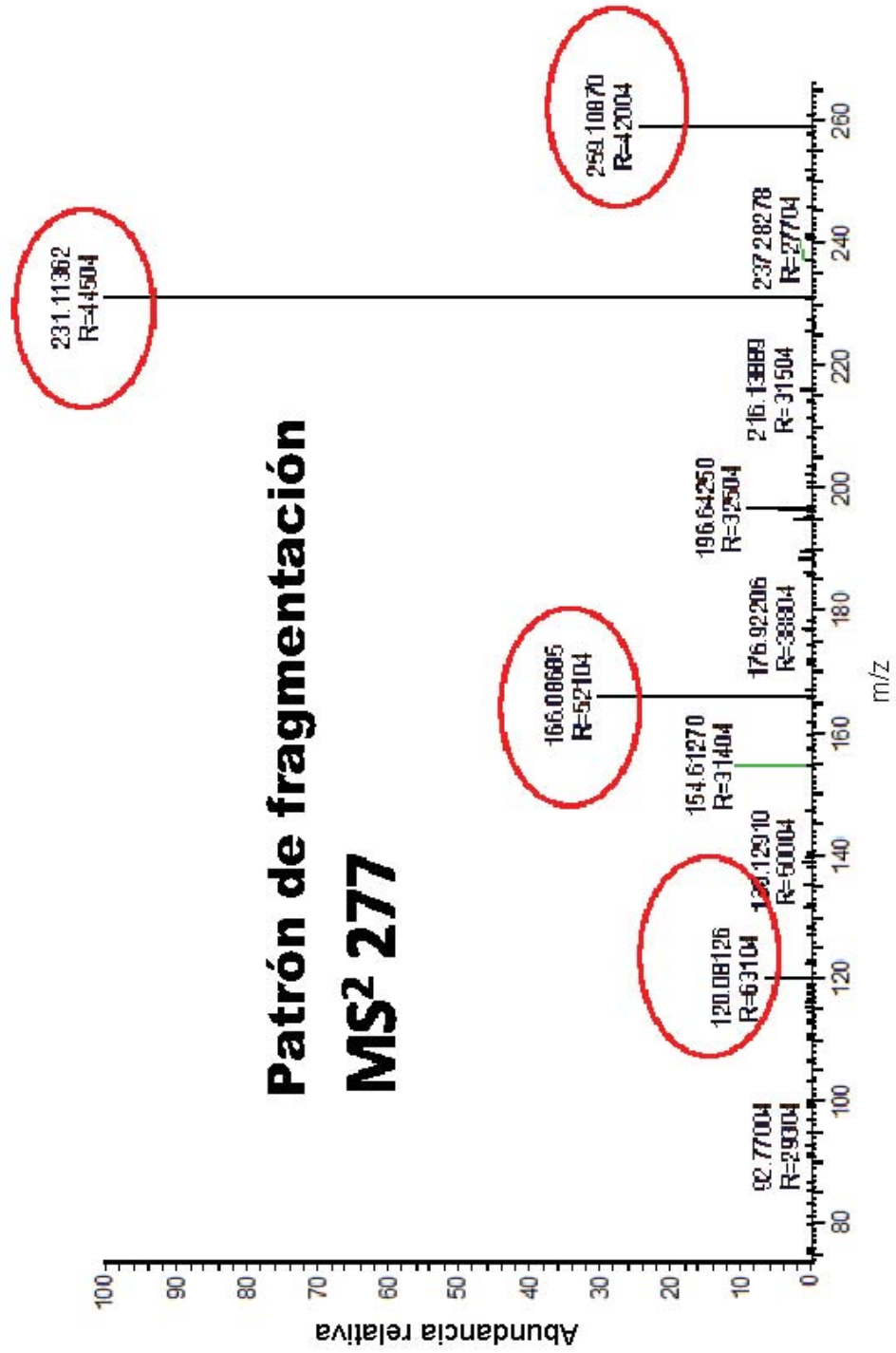


Fig. 5

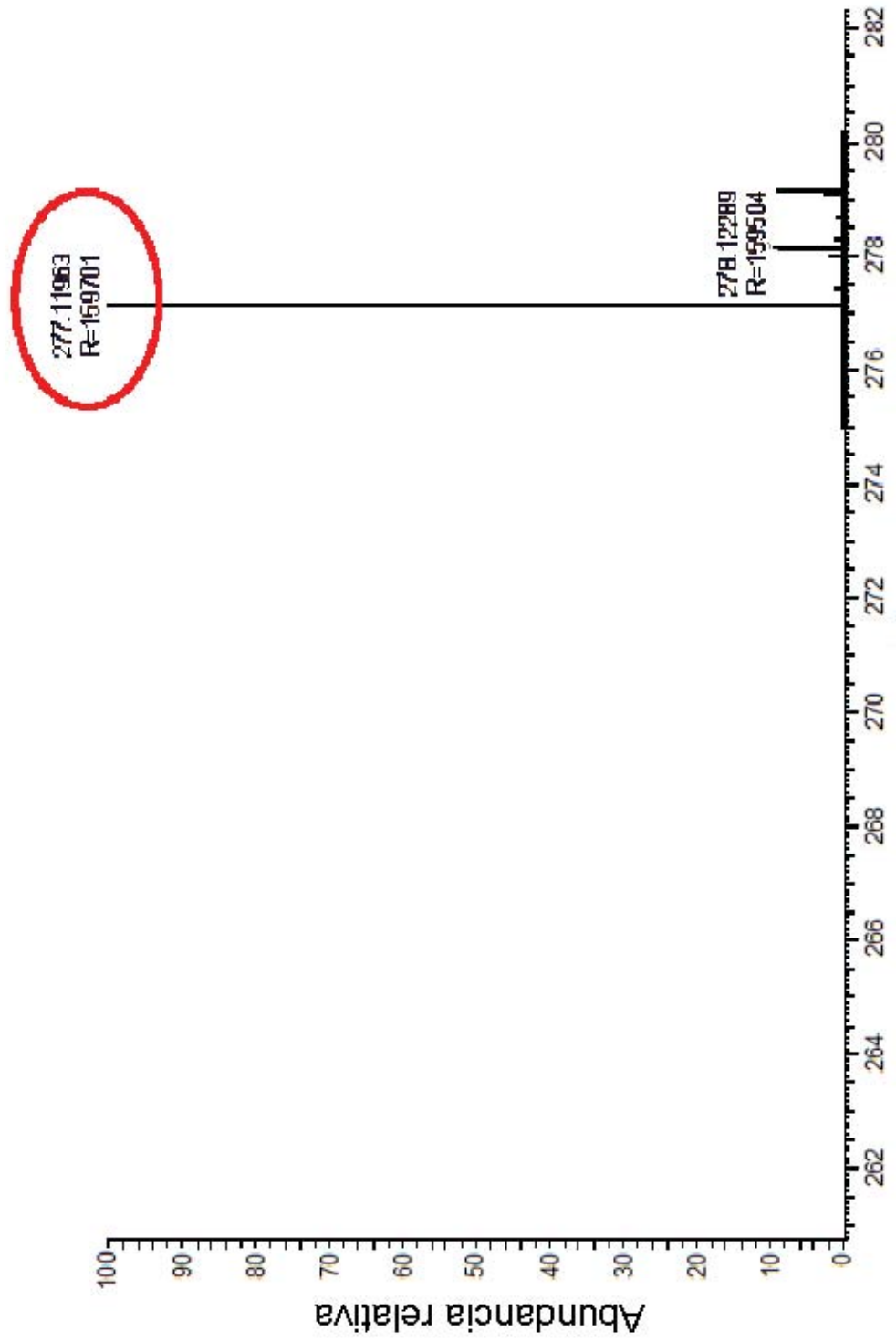


Fig. 6

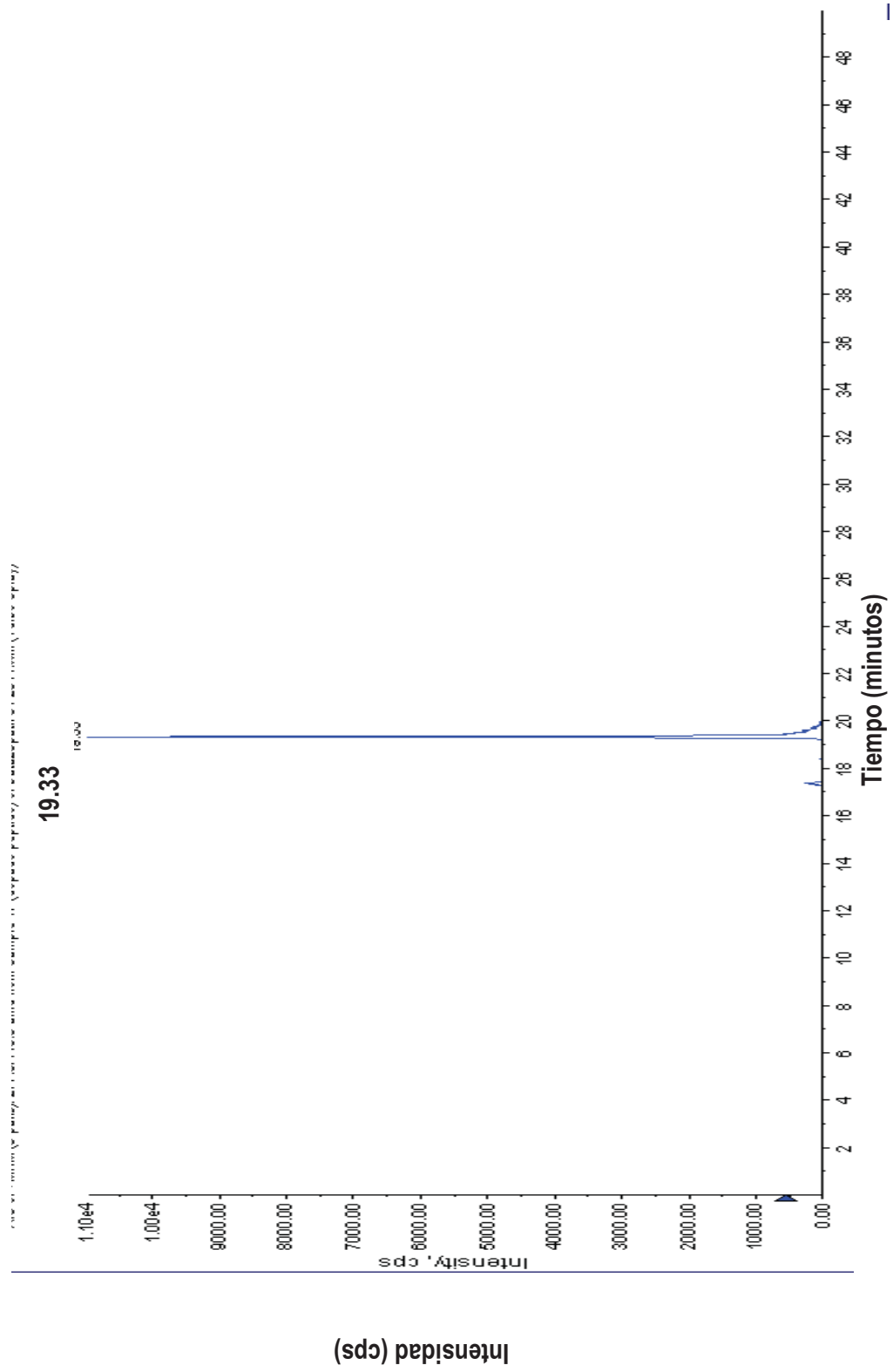
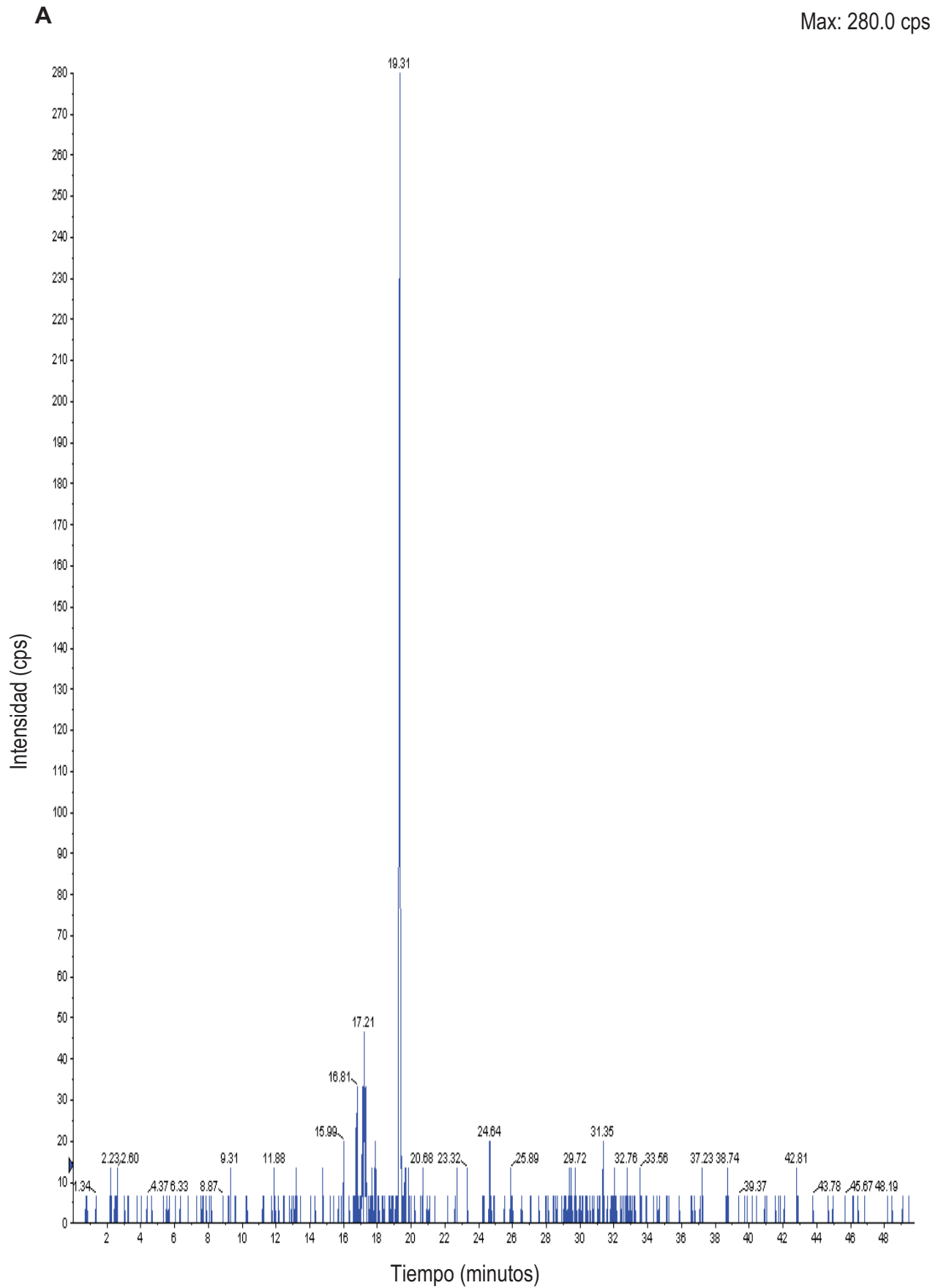


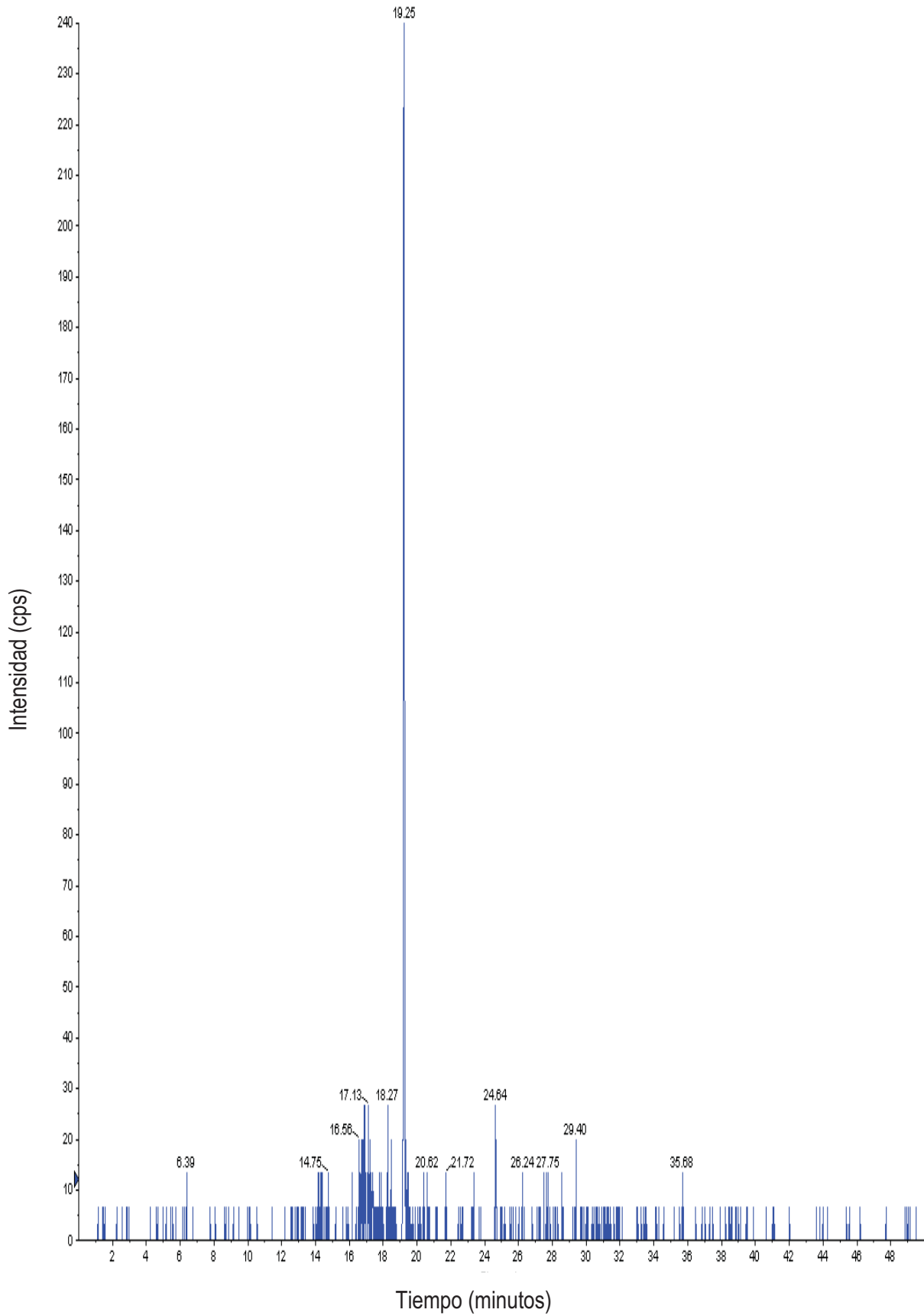
Fig. 7



**Fig. 8**

B

Max: 240.0 cps



**Fig. 8 (cont.)**

C

Max: 60.0 cps

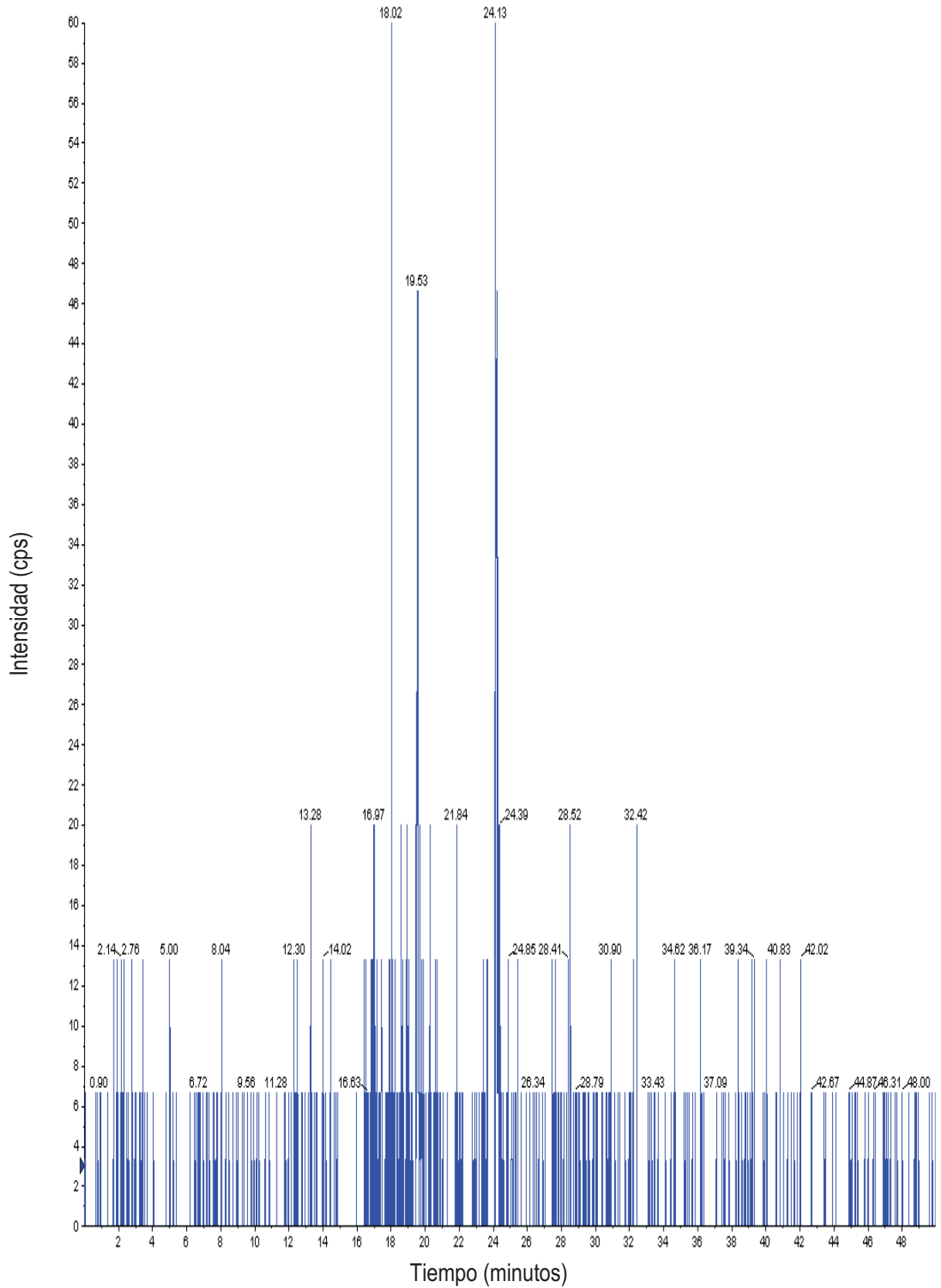
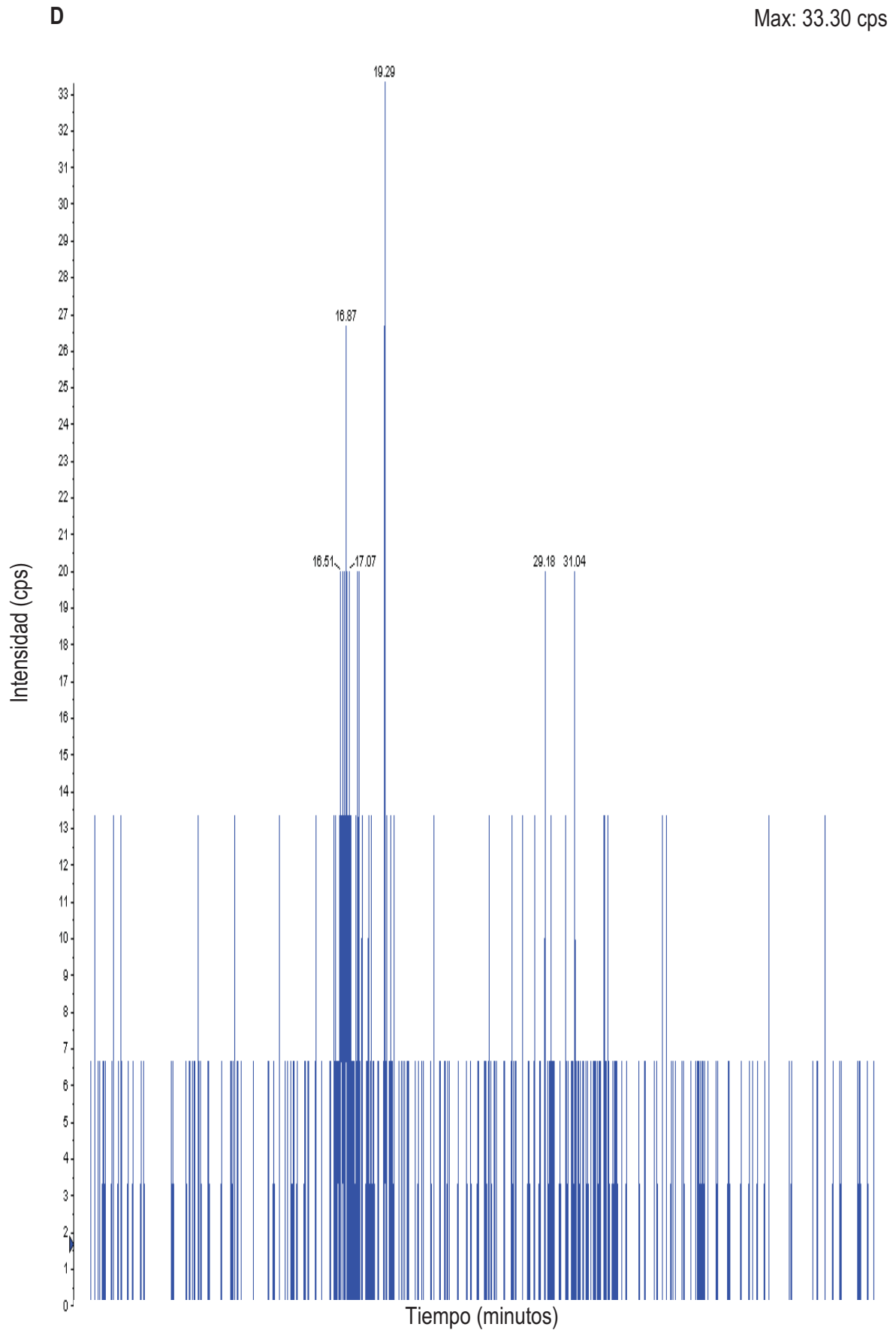


Fig. 8 (cont.)



**Fig. 8 (cont.)**





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201132122

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.12.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | SFORZA, S. et al. "Accumulation of non-proteolytic aminoacyl derivatives in Parmigiano-Reggiano cheese during ripening". INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL. Octubre 2009. Vol. 19, N.º. 10, páginas 582-587; todo el documento. | 1-27                       |
| A         | US 20110183925 A1 (SATO, K. et al.) 28.07.2011, todo el documento, especialmente párrafos [0019],[0104], tabla 2.   | 1-27                       |
| A         | US 20090011447 A1 (BANOUB, J.H. et al.) 08.01.2009, todo el documento.  | 1-27                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
28.03.2012

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/68** (2006.01)

**G01N33/74** (2006.01)

**C07K5/06** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.03.2012

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-27 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-27 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**Consideraciones:**

La invención consiste en un método para determinar la administración exógena de 17 $\beta$ -estradiol a animales bovinos, en la que se determina la presencia y concentración en suero del dipéptido D-Pyr-L-Phe.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación  | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01       | SFORZA, S. et al. "Accumulation of non-proteolytic aminoacyl derivatives in Parmigiano-Reggiano cheese during ripening". INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL. Octubre 2009. Vol. 19, N°. 10, páginas 582-587; todo el documento. |                   |
| D02       | US 20110183925 A1 (SATO, K. et al.)  | 28.07.2011        |
| D03       | US 20090011447 A1 (BANOUB, J.H. et al.)  | 08.01.2009        |

El documento D01, describe la identificación de péptidos N- $\gamma$ -glutamil-, N-piroglutamil- y N-lactoil- durante el proceso de maduración del queso Parmigiano-Reggiano. Entre los péptidos identificados está el dipéptido D-Pyr-L-Phe (ver figura 5). Los péptidos identificados se relacionan con el sabor y podrían utilizarse para valorar la calidad del queso.

El documento D02, describe la actividad del péptido L-Pyr-L-Phe como antiinflamatorio

El documento D03, describe la cuantificación de vitelogenina, proteína sintetizada en respuesta a la presencia de estrógenos circulantes en animales ovíparos, mediante el análisis de péptidos testigo que se eligen entre los péptidos que resultan de la digestión con tripsina. La cuantificación se realiza con la vitelogenina plasmática de la trucha arcoiris, el salmón atlántico y el bacalao atlántico.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

**Reivindicaciones 1-27**

No se ha encontrado en el estado de la técnica, ningún documento que relacione la presencia en suero de animales del dipéptido D-Pyr-L-Phe, con la administración de 17 $\beta$ -estradiol. Dicho dipéptido solamente ha sido identificado previamente en el queso Parmigiano-Reggiano y se relaciona en este caso con uno de los compuestos responsables del sabor del producto e indicador del grado de maduración del mismo. El dipéptido Pyr-L-Phe, ha sido descrito en el documento D02, como antiinflamatorio, pero en este caso se trata del isómero en el que el ácido piroglutámico está en la forma L. Por tanto, se considera que los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal como se contempla en las reivindicaciones. Por tanto, el objeto de la presente solicitud, cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.