

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 037**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2014 PCT/EP2014/053654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2014 E 14706597 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2959294**

54 Título: **Método para evaluar la acción selectiva de una molécula de interés por un tejido**

30 Prioridad:

**25.02.2013 EP 13305211**

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

**07.12.2018**

73 Titular/es:

**IMABIOTECH (100.0%)  
885, avenue Eugene Avinee  
59120 Loos, FR**

72 Inventor/es:

**HAMM, GRÉGORY y  
STAUBER, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 693 037 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para evaluar la acción selectiva de una molécula de interés por un tejido

### Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para valorar la distribución de una molécula de interés en un tejido destinatario. Más en concreto, la invención da a conocer un método para evaluar si una molécula de interés se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario predeterminado mediante la comparación con al menos un compuesto de control. El método de la invención permite, en otras palabras, evaluar la especificidad, la adsorción, la distribución, la vectorización, el metabolismo de una molécula de interés y/o de sus metabolitos sobre un tejido destinatario.

10 El método de la invención halla su aplicación en todos los dominios que implican el estudio del comportamiento de una molécula de interés en un sistema experimental, a saber, en uno o varios tejidos biológicos. El método de la invención se puede utilizar ventajosamente en la proteómica, en la lipidómica o en la investigación farmacéutica para escrutar las moléculas candidatas y evaluar su potencial terapéutico o diagnóstico.

### Antecedentes de la invención

15 El desarrollo de un fármaco, desde el descubrimiento de la primera molécula candidata hasta poner el producto en el mercado, es un procedimiento largo y costoso, que implica una inversión significativa de recursos humanos y de equipamiento. En especial, los ensayos clínicos que implicaban la experimentación con humanos podían durar varios años. El objetivo de estos ensayos es garantizar la eficacia del fármaco, poner de relieve los posibles efectos secundarios y evaluar los problemas relativos a la seguridad de los medicamentos.

20 Antes de realizar estos ensayos clínicos, los ensayos preclínicos tienen gran importancia. Durante este desarrollo preclínico es cuando se consigue identificar, seleccionar y validar la molécula candidata. El desarrollo preclínico utiliza específicamente ensayos con animales para estudiar la farmacología de una molécula candidata. En particular, el propósito de estos estudios farmacológicos es validar *in vitro* e *in vivo* el mecanismo de acción y medir la actividad de la molécula candidata en los modelos de enfermedad en los animales. Además, proporcionan una evaluación del comportamiento de la molécula candidata y de su posible transformación en un organismo vivo, y ayudan a establecer sus órganos o tejidos destinatarios y la dosis tóxica para el modelo.

25 Por consiguiente, la relevancia de los ensayos clínicos está relacionada con los estudios preclínicos previos durante los cuales una gran cantidad de moléculas, interesantes a primera vista, quedan descartadas al final. Los estudios preclínicos deben permitir una selección fiable, entre docenas de moléculas candidatas, de la más prometedora que podrá ser un ingrediente activo en una formulación farmacológica para el tratamiento de una enfermedad dada. Una evaluación preclínica deficiente puede conducir a la selección de una molécula candidata que mostrará su ineficacia en las fases clínicas, lo que provoca pérdidas en términos de tiempo y costes.

30 Por lo tanto, es importante disponer de investigaciones fiables para evaluar si una molécula candidata actúa sobre la diana correcta, sobre todo en un tejido determinado, y no acarrea efectos secundarios ni queda bloqueada por una barrera biológica. Por ejemplo, numerosas moléculas identificadas *in vitro* como posibles compuestos activos para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) acaban por no ser capaces, durante los ensayos *in vivo*, de atravesar la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, resultan totalmente ineficaces.

Hoy día, más del 35% de las moléculas candidatas descartadas en los ensayos clínicos se han seleccionado de manera errónea en las fases preclínicas tras la evaluación incorrecta de su acción sobre el tejido destinatario.

40 Por esa razón, existe la necesidad real de métodos fiables para la selección de moléculas candidatas que garanticen su alta especificidad de fijación por un tejido destinatario dado, lo que permitirá la evaluación fidedigna de su farmacocinética dentro de este tejido. También hay una necesidad, en el caso del desarrollo de productos fitosanitarios, de tener más datos sobre la posible toxicidad o no del producto en el organismo vivo mediante el uso de un método para evaluar si una molécula candidata se fija o se incorpora a al menos un tejido destinatario.

### Compendio de la invención

45 En este contexto, los inventores desarrollaron un método para valorar la eficacia de la acción selectiva de una molécula de interés en un tejido dado. El método de la invención permite validar la capacidad que tiene esta molécula para atravesar una o varias barreras biológicas después de la administración hasta alcanzar dicho tejido, pero también para valorar la especificidad de la molécula por dicho tejido. De forma más general, el método de la invención permite la evaluación *ex vivo* o *in vitro* de parámetros biológicos de la molécula de interés, tales como su absorción, su vectorización y/o su metabolismo en función del tejido destinatario o del sistema experimental elegido.

50 Así pues, el método de la invención se puede utilizar para conseguir un cribado rápido y fiable de las moléculas con un posible efecto terapéutico y para ser capaz de seleccionar la que podrá entrar en una formulación farmacológica para tratar una enfermedad dada en función del tejido destinatario. El método de la invención también se puede aplicar para verificar los posibles efectos secundarios que tiene la molécula de interés, por ejemplo, en uno o varios

tejidos a los que la molécula se puede fijar y que no son los destinatarios. De igual forma, el método de la invención se puede utilizar en la proteómica, por ejemplo, para el escrutinio de biomarcadores con el que seleccionar una o varias moléculas diagnósticas fiables para una enfermedad dada.

5 Hoy día, se han descrito un gran número de moléculas y se las ha clasificado según su tejido destinatario, su especificidad o no por dicho tejido, etc. En la presente invención, los inventores proponen la utilización de sus conocimientos previos para seleccionar nuevas moléculas candidatas. Más en concreto, el método de acuerdo con la invención propone utilizar, como marcador, una molécula con propiedades bien conocidas en el tejido destinatario y comparar su distribución en dicho tejido con la distribución de la molécula candidata. Se puede utilizar cualquier método que permita la visualización *ex vivo* o *in vitro* de la distribución de una molécula dentro de un tejido. En  
10 concreto, la localización del marcador y de la molécula candidata se puede realizar en el animal entero mediante la toma de imágenes por resonancia magnética (RMN) o en cortes de tejido, por ejemplo, mediante la toma de imágenes por espectrometría de masas (EM).

15 El propósito de la invención es un método para evaluar si una molécula de interés se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario, lo que comprende la visualización y la comparación de la distribución de la molécula de interés y de al menos un compuesto de control dentro del tejido destinatario o sobre la superficie del tejido destinatario de al menos un animal que ha recibido con anterioridad la molécula de interés y/o el compuesto de control.

20 El método de la invención se puede utilizar para evaluar la distribución de todas las moléculas medibles mediante el uso de técnicas de toma de imágenes, sobre todo una proteína, un péptido, un lípido, un anticuerpo, un ácido nucleico, un compuesto orgánico o inorgánico, etc. Más en concreto, la molécula de interés es una molécula candidata, por consiguiente exógena, que está implicada o puede estar implicada en un desarrollo farmacéutico o fitosanitario. De acuerdo con la invención, la molécula candidata también se refiere a una molécula con un potencial farmacéutico o fitosanitario, o uno de sus metabolitos.

25 El tejido destinatario estudiado puede ser un órgano completo, una región específica dentro de un órgano, una barrera biológica, etc. Por ejemplo, el tejido destinatario es un órgano tal como un pulmón, un ojo, un hígado, un riñón, un corazón, etc., o una barrera biológica tal como la barrera hematoencefálica, o una región específica de un órgano, tal como un tejido tumoral, sobre todo un tejido tumoral encefálico, etc.

De acuerdo con la invención, el compuesto o compuestos de control y la molécula de interés se pueden coadministrar al animal con anterioridad.

30 Ventajosamente, la concentración del compuesto o compuestos de control y de la molécula de interés está adaptada al modelo de animal estudiado. En algunas realizaciones, estas concentraciones son idénticas.

La administración se puede realizar por una vía enteral o parenteral.

En una realización concreta, la visualización y comparación de la distribución de la molécula de interés y del compuesto de control se realizan sobre la superficie de al menos un corte del tejido destinatario obtenido de un muestreo anterior del tejido del animal, o de la retirada del tejido.

35 Cuando se utiliza la técnica de toma de imágenes por espectrometría de masas, se puede añadir una etapa de normalización de las señales que están asociadas, respectivamente, a los espectros de masas de la molécula de interés y al compuesto de control sobre la superficie del corte del tejido destinatario. Con este fin, las características espectrales seleccionadas, tal como la señal para la molécula escogida en la muestra, se pueden ponderar mediante un coeficiente de extinción de tejido (CET) específico tanto para la molécula como para el tejido destinatario. Esta  
40 ponderación normaliza la señal y la hace dependiente únicamente de la cantidad de la molécula en el origen de la señal. Además, cuando se utiliza una matriz de MALDI, se puede ponderar la señal asociada a los espectros de masas de la molécula escogida y de los compuestos de control en dicho tejido para tener en cuenta la homogeneidad del depósito de la matriz de MALDI.

45 Ventajosamente, el método de la invención se aplica a un tejido de un animal al que se le ha administrado con anterioridad la molécula de interés y tanto un compuesto de control positivo como un compuesto de control negativo.

El método de la invención también se puede utilizar con una muestra de tejido de un animal al que se le ha administrado con anterioridad la molécula de interés y un compuesto intermedio de control.

50 Preferiblemente, la etapa de visualización para obtener la distribución de la molécula de interés se consigue mediante el uso de una técnica de toma de imágenes, en especial mediante el uso de la toma de imágenes por espectrometría de masas y sobre todo la toma de imágenes por MALDI.

De acuerdo con la invención, se puede evaluar la especificidad de una molécula de interés por el tejido destinatario al comparar la distribución de dicha molécula dentro del tejido destinatario con la distribución de dicha molécula de interés en al menos otro tejido que no es el destinatario.

De acuerdo con la invención, se puede evaluar la proporción de penetración tisular de la molécula de interés en el

tejido destinatario al comparar la distribución de dicha molécula dentro del tejido destinatario con la distribución de un compuesto de control dentro del mismo tejido destinatario.

El método de la invención también permite calcular un coeficiente de selectividad por un tejido que tiene la molécula de interés por el tejido destinatario, que tiene en cuenta la especificidad de la molécula por dicho tejido y la proporción de penetración tisular de dicha molécula en dicho tejido.

En una realización concreta, el método de la invención puede comprender una etapa de evaluación de la de la cinética de eliminación de la molécula de interés en el tejido destinatario que compara la distribución de dicha molécula en al menos dos cortes del tejido destinatario que se obtuvieron anteriormente mediante muestreo, en diferentes tiempos (t1) y (t2), de los animales a los que se había administrado con anterioridad la molécula de interés y el compuesto de control.

La invención también hace referencia a un soporte de datos legible por ordenador que comprende instrucciones informáticas ejecutables idóneas para permitir que un sistema informático ejecute la comparación de la distribución de la molécula de interés con la distribución del compuesto de control según el método de la invención.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: representación esquemática de la distribución de tres moléculas de interés M1, M2 y M3 y de dos compuestos de control, M+ es el control positivo y M- es el control negativo, obtenida durante el experimento de toma de imágenes por espectrometría de masas sobre cortes de tejido que comprenden el tejido destinatario (T1) y un tejido periférico, que no es el destinatario. La especificidad de cada molécula de interés se valora al comparar la distribución (firma espectral) de las moléculas de interés con la distribución (firma espectral) de los compuestos de control positivo (M+) y negativo (M-), en dichos tejidos destinatario y que no es destinatario.

Figura 2: representación esquemática de la distribución de las tres moléculas de interés M1, M2 y M3 y de los dos compuestos de control, el positivo (M+) y el negativo (M-), obtenida durante el experimento de toma de imágenes por espectrometría de masas en cortes de tejido que comprenden el tejido destinatario (T1) y un tejido periférico, que no es el destinatario. La similitud y/o disimilitud de la distribución de cada una de las moléculas de interés en comparación con la distribución de los compuestos de control permite apreciar las similitudes espaciales de la distribución de cada molécula dentro del tejido destinatario. La proporción de penetración tisular para las moléculas de interés se evalúa al comparar los mapas de intensidad de dichas moléculas de interés y de los compuestos de control en relación con la cantidad de los compuestos de control en dicho tejido destinatario.

Figura 3: imágenes relacionadas con la tinción histológica (figura 3A), distribución molecular (figura 3B) y vista esquemática (figura 3C) de un corte de tejido renal de un ratón, en donde se han inyectado con anterioridad olanzapina (molécula de interés Mc), posaconazol (compuesto de control positivo M+) y metsuximida (compuesto de control negativo M-). La imagen molecular muestra con claridad dos áreas diferentes (figura 3B) relacionadas, respectivamente, con el compuesto de control positivo (centro de la figura 3B) y con el compuesto de control negativo (en torno al área del control positivo de la figura 3B). Esto permite delimitar con facilidad el tejido destinatario, a saber, la región media del riñón, o médula (tejido 1 en el centro de la figura 3C) con respecto a un tejido que no es el destinatario, a saber, la región externa del riñón, o corteza renal (tejido periférico 2 de la figura 3C).

Figura 4: espectro de masas de olanzapina (A), metsuximida (B) y posaconazol (C), que corresponde, respectivamente, a la coordenada de imágenes no solapantes a nivel del área de tejido de intensidad alta de la olanzapina (A), de tejido que no es el destinatario (B) y de tejido destinatario (C). También se presenta el patrón de isótopos de cada ion que corresponde a dichas moléculas (véanse los insertos que hay encima de los correspondientes espectros de masas).

Figura 5: visualización, en un corte de tejido renal de ratón, de la distribución del posaconazol (compuesto de control positivo M+) a nivel de la región de la médula (imagen de la izquierda de la figura 5), de la olanzapina (molécula de interés Mc) en el riñón completo (imagen en el centro de la figura 5), de la metsuximida (compuesto de control negativo M-) a nivel de la corteza renal (imagen de la derecha de la figura 5) mediante el uso de imágenes por espectrometría de masas. Las líneas discontinuas indican las regiones periférica y media del riñón.

Figura 6: superposición de la distribución, sobre las imágenes de cortes de tejido renal de ratón, de la molécula de interés, Mc, y del compuesto de control positivo, M+, (imagen de la izquierda de la figura 6); de la molécula de interés, Mc, y del compuesto de control negativo, M-, (imagen en el centro de la figura 6) y de los dos compuestos de control, M+ y M- (imagen de la derecha de la figura 6). La evaluación precisa de la similitud/disimilitud de estas distribuciones se obtiene con facilidad mediante la superposición de imágenes sucesivas.

Figura 7: representación esquemática de una estrategia para valorar la eficacia de afinidad del agonista de acuerdo con una realización del método de la invención en el caso de un estudio de ocupación de receptor.

Figura 8: representación esquemática de una estrategia para valorar la eficacia de afinidad del agonista de acuerdo con otra realización del método de la invención en el caso de un estudio de ocupación de receptor.

**Descripción detallada de la invención**

El método de la invención se basa en la comparación del comportamiento que tiene un compuesto de control en un tejido destinatario específico en el que ya se conocen las propiedades de compartimentación para dicho tejido, con una molécula de interés que tiene propiedades de compartimentación desconocidas para dicho tejido y que se tienen que estudiar. Después de la administración de estas moléculas a un animal y comparar la distribución de estas moléculas en el tejido destinatario del animal, se puede validar si la presencia de la molécula de interés dentro de dicho tejido es significativa o no es significativa, pero también la especificidad de la acción selectiva sobre el tejido, su proporción de penetración tisular, la cantidad relativa o absoluta en dicho tejido, así como su metabolismo, regulación, etc.

En función de la molécula de interés y del tejido destinatario, se puede evaluar la mejor vía de administración, para verificar la buena vectorización de la molécula en el organismo o para validar su capacidad para atravesar barreras biológicas hasta alcanzar el tejido destinatario.

**Elección de los compuestos de control**

Antes del estudio de los parámetros biológicos que tiene la molécula de interés, es importante elegir con gran precisión los compuestos de control con una especificidad predeterminada por un tejido destinatario que servirán de referencia.

Un compuesto de control es una molécula de la que ya se conocen sus propiedades por un tejido destinatario, a saber, su biodisponibilidad (capacidad para actuar selectivamente sobre un tejido), su vectorización (presencia/concentración en el tejido destinatario/capacidad para atravesar la barrera biológica) y/o su regulación (comportamiento de la molécula dentro del tejido destinatario). El compuesto de control suele ser un compuesto exógeno al tejido destinatario estudiado. Así pues, un «compuesto de control positivo» es una molécula que se sabe que se distribuye específicamente en el tejido destinatario después de la administración al animal elegido como modelo de estudio. Preferiblemente, para ayudar a la explicación de más datos, un compuesto de control positivo no se localiza/distribuye en los tejidos que no son los destinatarios pero que están adyacentes al tejido destinatario. Por el contrario, un «compuesto de control negativo» es una molécula que se sabe que está ausente en el tejido destinatario después haberle sido inyectada al animal. De acuerdo con la invención, también se puede utilizar un compuesto de control «intermedio» que pone de relieve las propiedades intermedias en el tejido destinatario, en comparación con los compuestos de control positivo y negativo. En especial, un compuesto de control intermedio puede ser una molécula que actúa selectivamente sobre dos tejidos diferentes con la misma proporción o una proporción diferente (por ejemplo, 60/40, 70/30, etc.). En adelante, «molécula de control», «control» o «marcador» se pueden utilizar indistintamente para hacer referencia a un «compuesto de control».

La elección de los compuestos de control está relacionada con el tejido destinatario estudiado mediante el uso del método de la invención. Por ejemplo, el diazepam se sabe que se localiza en el cerebro después de la inyección, mientras que su distribución es muy escasa en el riñón. Por consiguiente, esta molécula puede utilizarse como un compuesto de control positivo para el cerebro, así como un compuesto de control negativo para el riñón. De igual forma, la olanzapina se localiza en el cerebro, mientras que no se localiza en el pulmón. Por consiguiente, la olanzapina puede utilizarse como un compuesto de control positivo para el cerebro al igual que como un compuesto de control negativo para el pulmón.

Las propiedades de la molécula pueden depender también del modelo de animal estudiado. Así pues, para un estudio dado, las propiedades de la molécula de interés y de los compuestos de control se tendrán en cuenta siempre preferiblemente para el tejido destinatario del mismo modelo de animal.

Ventajosamente, para el estudio de una molécula de interés dada en un tejido destinatario dado, se utilizan al menos un compuesto de control positivo y un compuesto de control negativo para comparar la distribución de la molécula de interés con la distribución de estos dos compuestos de control. Naturalmente, también se puede utilizar solo un compuesto de control. En este caso, se prefiere un compuesto de control positivo.

Para ayudar a conocer mejor la distribución de las moléculas en el tejido destinatario, se utilizan ventajosamente las moléculas de control que se pueden diferenciar con facilidad de la molécula de interés. Por ejemplo, en el caso de un estudio de imágenes por espectrometría de masas, se eligen ventajosamente los compuestos de control con una proporción de masa por carga lejos de la proporción de masa por carga de la molécula de interés. De igual forma, los compuestos de control y la molécula de interés se pueden marcar antes de la administración, por ejemplo, mediante el uso de diferentes marcadores fluorescentes.

Para facilitar y optimizar la elección de las moléculas de control y hacer posible la automatización del método, toda la información disponible sobre las moléculas que se podrían utilizar en potencia como compuestos de control se recogen ventajosamente en una base de datos. Estos datos pueden proceder de la bibliografía (artículos científicos, patentes...), de un estudio farmacéutico anterior, etc.

Los ejemplos de datos que se pueden introducir en esta base de datos figuran en la tabla que viene a continuación para las moléculas y tejidos específicos.

Tabla 1: Ejemplos de datos a tener en cuenta en la elección de los compuestos de control positivo y negativo en función de los tejidos u órganos.

Tejido destinatario	Controles +/-	m/z
Cerebro	+: Olanzapina	313
	-: Atenolol	267
Riñón	+: Oxaliplatino	398
	-: Diazepam	285
Hígado	+: Propranolol	260
	-: Floroquinolona	402
Pulmón	+: Tiotropio	432
	-: Olanzapina	313

+: control positivo; -: control negativo; m/z: proporción de masa por carga

##### 5 Administración de la molécula de control y de la molécula escogida:

Una vez que se han seleccionado los controles, las moléculas de control y escogida tienen que administrarse al animal utilizado como modelo de estudio.

En función del estudio deseado, el modelo animal puede cambiar. El experto en la técnica sabe qué modelo de animal se adapta mejor en función del tejido destinatario, de la molécula de interés, de las propiedades biológicas a evaluar, etc. Por ejemplo, en el caso de los ensayos preclínicos sobre una molécula candidata que requiere el sacrificio del animal, se utilizan preferiblemente mamíferos no humanos, tales como los roedores (ratones, ratas, conejos, hámster, etc.). Se pueden utilizar otros mamíferos no humanos, sobre todo monos, perros, etc. En algunos casos, cuando los tejidos destinatarios se pueden obtener mediante una biopsia sencilla, podría ser interesante utilizar un mamífero humano como modelo animal. También se pueden utilizar otros modelos animales, tales como peces, insectos, por ejemplo, para estudiar el impacto que tiene una molécula sobre el medio ambiente o sobre un medio ecológico concreto.

De acuerdo con una realización, se sacrifica dicho animal después de la administración de la molécula de interés y del compuesto o compuestos de control al animal no humano. De acuerdo con la invención, el método se realiza ventajosamente *ex vivo* y/o *in vitro*.

De acuerdo con la invención y en términos generales, se pueden utilizar todas las vías de administración de las moléculas de control y escogida, tales como la vía enteral (a saber, la administración del fármaco mediante el proceso de digestión en un tubo digestivo) o la vía parenteral (a saber, otra vía de administración que no es el tubo digestivo). Por ejemplo, las moléculas se pueden administrar por vías diferentes, tales como epicutánea, epidural, intraarterial, intravenosa, subcutánea (con una localización específica), intracardiaca, inyección intracavernosa, intracerebral, intradérmica, intramuscular, infusión intraósea, intraperitoneal, intratecal, intravesical, intravítrea, nasal, oral, rectal o intravaginal.

La vía de administración se puede elegir en función de la molécula de interés, del tejido destinatario del método, etc.

El método de la invención también puede permitir la selección de la vía de administración más adaptada. De hecho, el método de la invención permite evaluar la capacidad que tiene una molécula de interés para atravesar una barrera biológica hasta alcanzar el tejido destinatario. En este caso, se realizan ventajosamente experimentos en paralelo en las mismas condiciones (a saber, mismos compuestos de control, mismas concentraciones), y sólo se cambia la vía de administración.

De acuerdo con la invención, se pueden administrar al mismo animal varias moléculas de interés para estudiar simultáneamente el potencial de estas moléculas.

En una realización concreta, la molécula de interés y el compuesto o compuestos de control se coadministran al animal, a saber, se inyectan mediante el uso de un mismo medio, que incluye todas estas moléculas. Así pues, es cierto que la administración de todas las moléculas al animal tiene lugar en el mismo momento ( $t_0$ ). De lo contrario, se pueden administrar estas moléculas de manera independiente las unas de las otras, o la molécula de interés con independencia de los compuestos de control. En este caso, las moléculas se administran preferiblemente al animal al mismo tiempo ( $T_0$ ), por ejemplo, gracias a varias inyecciones simultáneas.

En otra realización, el compuesto de control se puede administrar a un animal diferente del animal al que se le administra la molécula de interés. Por ejemplo, se puede administrar la molécula de control positivo a un primer

animal, el compuesto de control negativo a un segundo animal, y la molécula de interés a un tercer animal. Sin embargo, debido a la variabilidad biológica entre los animales, estos experimentos se realizan preferiblemente en paralelo para hacer disminuir esta variabilidad.

5 En una realización específica, al animal se le administra la misma dosis de la molécula de interés y de cada compuesto de control. Así pues, se puede alcanzar además con facilidad la etapa de evaluación de la proporción de penetración.

10 En algunos casos, puede ser interesante la administración de dosis o concentraciones diferentes, en función de las moléculas, para tener en cuenta su especificidad biológica por el modelo animal estudiado. Ventajosamente, las propiedades del compuesto o compuestos de control en el modelo de animal ya son conocidas de tal manera que el experto en la técnica sabe si se deben adaptar las dosis. También se puede adaptar la dosis de la molécula de interés, por ejemplo, mediante la comparación con un compuesto análogo (con similitudes estructurales) cuyas propiedades en dicho modelo animal ya se han evaluado.

#### Estudio del caso de la barrera hematoencefálica

15 El método de la invención también se puede utilizar para seleccionar las moléculas candidatas durante el desarrollo farmacéutico de fármacos que actúan selectivamente sobre el sistema nervioso central, así como sobre una región histológica específica del cerebro, sobre todo tejido tumoral. De hecho, tales moléculas deben ser capaces, tras la administración (por ejemplo, por inyección) al paciente, de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés blood-brain barrier). Esta barrera fisiológica, compuesta principalmente por las células endoteliales que revisten los capilares sanguíneos, separa el torrente circulatorio del líquido cefalorraquídeo. La barrera hematoencefálica protege al cerebro ante los agentes patógenos, toxinas y hormonas que circulan por la sangre, pero puede también limitar la penetración de algunos fármacos. La evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica para las moléculas candidatas es un factor decisivo de la medición de la eficacia de un posible tratamiento relacionado.

25 Ventajosamente, el tal caso, el método de la invención se realiza mediante la toma de imágenes por espectrometría de masas (EM), utilizada ampliamente para estudiar el sistema nervioso central desde que empieza a desarrollarse. La mejora continua de la resolución espacial disponible durante el experimento de EM da acceso a una estructura histológica y biológica tan delicada como puede serlo la barrera hematoencefálica.

30 El método de la invención permite obtener un modelo de estudio de la barrera hematoencefálica mediante el uso del compuesto de control positivo que atraviesa la barra hematoencefálica (por ejemplo, el diazepam) y un compuesto de control negativo que no atraviesa la barrera hematoencefálica (por ejemplo, el atenolol). Estos marcadores, después de la administración al animal, se siguen mediante EM directamente sobre el corte del tejido cerca de los vasos sanguíneos. Así pues, se puede evaluar la eficacia de la acción selectiva de la molécula de interés, tal como un fármaco contra el cáncer, por ejemplo para el tratamiento de un glioblastoma multiforme, mediante la comparación de la distribución de la molécula de interés (o de sus metabolitos) con la distribución de los marcadores positivo y/o negativo en dicho tejido.

35 Estudio del caso de adsorción: ejemplo de ocupación del receptor

40 En farmacología, la ocupación del receptor se define por la capacidad que tiene un agonista (una molécula pequeña o grande, tal como un fármaco) para fijarse a un receptor o enzima específicos dentro del tejido biológico. Esta fijación implica una respuesta funcional en el organismo que conduce a un tratamiento eficaz de una patología o enfermedad. Se pueden utilizar diferentes mecanismos para conseguir la fijación, por ejemplo, enlace covalente, interacción iónica, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, etc. La afinidad de un agonista por un receptor se puede evaluar para elegir el mejor fármaco candidato para dicho receptor, que muestra por ejemplo un grado alto de fijación y una eficacia de acción completa. Se puede producir una fijación competitiva que implica, por ejemplo, un agonista y un antagonista, que tienen diferente afinidad por el mismo receptor. En este caso, hay una competición entre dos moléculas diferentes ya que el receptor sólo puede estar fijado a una molécula en cada momento.

Ventajosamente, el método de la invención se puede utilizar para valorar esta competición directamente dentro de los cortes de tejido, con la EM o con cualquier técnica de toma de imágenes moleculares para evaluar la afinidad de una molécula de interés (el agonista) por un receptor o enzima específicos mediante la comparación con un marcador positivo (el antagonista) con una gran afinidad de fijación.

50 Según una realización, después de la administración de la molécula de interés al modelo biológico y la toma de muestras, el tejido destinatario se puede lavar con una solución que contiene el antagonista (el marcador positivo) y se deja incubar. Como alternativa, el experimento se puede realizar mediante una coadministración de las moléculas (agonista y antagonista). El marcador positivo (el antagonista competitivo) competirá con la molécula de interés (agonista) que ya esta fijada al receptor. Se puede utilizar entonces la EM para seguir al agonista y al antagonista en el corte de tejido que recibió las dosis. La eficacia del candidato se puede evaluar al comparar la intensidad y la localización de las dos moléculas competidoras sobre las imágenes moleculares resultantes. Se pueden registrar diferentes parámetros, tales como la concentración del agonista/antagonista, la duración de la incubación, etc. Se puede valorar la localización del propio receptor sobre el corte del tejido en función de su potencial de ionización,

sobre todo para las especies moleculares grandes. Se pueden aplicar diferentes estrategias para detectar el receptor o las enzimas en el tejido (digestión, marcación, etiquetas para EM...). Por ejemplo, se pueden aplicar diferentes estrategias para valorar la ocupación del receptor, al combinar el protocolo *in vivo/ex vivo*. Por ejemplo, se puede incubar el agonista y el antagonista en el corte de tejido, así como administrar ambos compuestos al mismo tiempo, etc. No hay ninguna limitación a la hora de realizar esta clase de evaluación mediante la toma de imágenes moleculares.

#### Formas de iones de aductos

Para el experimento de toma de imágenes por espectrometría de masas, todos los marcadores o las moléculas escogidas se pueden detectar como protonados  $[M+H]^+$  o desprotonados  $[M-H]^-$  para el modo de ionización positiva o negativa, respectivamente. No obstante, se pueden detectar en el espectro de masas como una forma de aducto con diferentes contraiones. Por ejemplo, podría ser potasio  $[M+K]^+$ , sodio  $[M+Na]^+$ , cloruro  $[M+Cl]^-$ , etc. Esta lista no es exhaustiva.

#### Preparación del tejido destinatario

El método de la invención permite visualizar una molécula de interés en al menos un tejido destinatario dado de interés.

En el contexto de la invención, el término «tejido» se refiere a una serie de células funcionales agrupadas. El tejido destinatario puede ser un conjunto de células similares con el mismo origen, un órgano, una parte de un órgano, una región específica de un órgano con, optativamente, aglomeraciones de muchas células. Por ejemplo, el tejido destinatario puede ser un tumor localizado dentro de un órgano.

De acuerdo con la técnica de visualización utilizada, puede ser necesario o útil realizar etapas de preparación previas en dicho tejido.

De acuerdo con el modelo de animal y/o tejido destinatario elegido, se puede realizar un análisis *ex vivo*, por ejemplo, en un corte de tejido. En tal caso, se muestrea el tejido o la muestra del tejido en un momento dado después de la administración (t1). El muestreo puede ser de una muestra de biopsia, sobre todo cuando el animal es un mamífero humano. En el caso de un animal no humano, el sacrificio del animal se puede realizar antes del muestreo.

En una realización concreta, el análisis se puede conseguir sobre un corte de tejido. En este caso, el corte del tejido se puede obtener de tejido fresco, de tejido congelado o de tejido fijado/incluido, por ejemplo, en parafina. Se pueden utilizar todos los medios idóneos para obtener cortes delgados del tejido, con un grosor de unos pocos micrómetros.

Si fuera necesario, los cortes de tejido pueden recibir un tratamiento previo, en particular según las moléculas a detectar, la técnica analítica, etc. Así pues, se pueden utilizar agentes químicos o bioquímicos sobre cortes de tejido para optimizar la detección de la molécula de interés y de los compuestos de control. Por ejemplo, se pueden utilizar solventes y/o detergentes para permitir la detección de determinadas clases de moléculas o para mejorar la extracción directa de las moléculas desde el tejido. También se pueden utilizar enzimas específicas capaces de escindir péptidos o proteínas para actuar selectivamente sobre, por ejemplo, fragmentos de digestión que tienen la misma localización y/o cantidad tisular que la molécula original. También se puede realizar la marcación con anticuerpos (conjugados o no a una etiqueta) sobre cortes de tejido, o utilizar moléculas marcadas con fluorescencia o radioactividad para permitir la detección de la molécula de interés y de los compuestos de control.

También se puede cambiar el modelo usado de animal no humano y/o el tejido destinatario y/o el corte de tejido para modificar su capacidad a la hora de fijarse a la molécula de interés o de incorporarla. Así pues, este tratamiento puede incluir una modificación química o biológica del modelo animal y/o del tejido destinatario y/o del corte del tejido que permite incrementar o inhibir la penetración o la capacidad de acción selectiva que tiene una molécula de interés sobre un tejido destinatario dado. Este tratamiento se puede realizar antes, después o durante la administración de la molécula de interés y/o del compuesto de control. Por ejemplo, en el caso de la barrera hematoencefálica, hay algunos transportadores expulsivos en la barrera que son capaces de se hacerse las moléculas que atraviesan la barrera hematoencefálica. El efecto de estos transportadores se puede modular (disminuir o suprimir) con inhibidores o con modificación genética, tal como una «genosupresión», del gen o de la expresión del gen de dichos transportadores.

Si las imágenes por espectrometría de masas que necesita una matriz se utilizan para estudiar el corte del tejido y, en especial, MALDI o ME-SIMS (espectrometría de masas de iones secundaria realizada con matriz), dicha matriz está adaptada ventajosamente a la molécula de interés. Por ejemplo, la elección puede tener en cuenta el intervalo de masas cubierto. El experto en la técnica sabe, a partir de las matrices existentes líquidas o sólidas, cuál de ellas se puede utilizar en función de las moléculas estudiadas y/o del tejido destinatario. De igual forma, se puede utilizar el método de depósito de la matriz, sobre todo la pulverización manual, la pulverización automática, la sublimación, la tamización y el microgoteo.

Visualización de la distribución molecular y tratamiento de los datos generados

La etapa de visualización de la distribución de las moléculas de interés y de los compuestos de control se puede realizar con cualquiera de las técnicas que permite la identificación exacta y la visualización, *in vivo* o *ex vivo*, de las moléculas de un tejido.

5 En el caso del análisis de un corte de tejido, se pueden utilizar técnicas relacionadas con toma de imágenes por espectrometría de masas, tales como toma de imágenes por MALDI (desorción e ionización por láser asistida por una matriz), LDI (desorción e ionización por láser), DESI (desorción por electropulverización), LESA (análisis de superficie por extracción de líquidos), LAESI (ionización por electropulverización con ablación por láser), DART (análisis directo en tiempo real), SMIS (espectrometría de masas de iones secundarios), JEDI (ionización por electropulverización con desorción a chorro), en combinación con diferentes clases de analizadores de masas, tal como TOF (tiempo de vuelo), Orbitrap, FTICR (resonancia ciclónica iónica con transformada de Fourier), cuádruplos (simple o triple), etc.

También se puede utilizar la fluorescencia, la inmunohistotinción o la química, etc. Como regla general, se pueden utilizar todas las técnicas que permiten visualizar la molécula en la superficie de un corte de tejido.

15 En el caso de un análisis por espectrometría de masas, se pueden utilizar varios modos de detección, tal como la espectrometría de masas directa (EM) o la espectrometría de masas en tándem (Msn, MRM, SRM...). Los parámetros experimentales, tales como el intervalo de masas, la fluidez del láser, se fijan para optimizar la detección dirigida en términos de intensidad, sensibilidad y resolución. Así pues, la adquisición de los espectros de masas se realiza para obtener una señal. A partir del espectro de masas, se puede tener acceso a los datos útiles para estudiar las moléculas escogidas. Para el tratamiento de los datos, se pueden utilizar diferentes características espectrales, tales como la intensidad máxima en el espectro de masas, la relación de señal por ruido (S/N, por su nombre en inglés), el área del máximo, etc. Por supuesto, para un estudio dado, se utilizan las mismas características espectrales para analizar la distribución de la molécula de interés y los compuestos de control.

Se pueden obtener resultados a partir del mismo corte de tejido o de diferentes cortes de dicho tejido. En algunos casos, puede ser preferible utilizar tantos cortes de tejido como moléculas a estudiar.

25 De acuerdo con la invención, la distribución de la molécula de interés se visualiza directamente sobre la superficie del tejido destinatario.

Para validar estos resultados, la distribución de la molécula de interés se compara con la distribución de los compuestos de control positivo y/o negativo. De este modo se evita la consideración de resultados que no sean significativos.

30 Al comparar la distribución de la molécula de interés en un tejido destinatario con otro tejido que no es el destinatario, por ejemplo un tejido adyacente, se puede confirmar si la molécula se distribuye específicamente en dicho tejido destinatario en vez del tejido adyacente. Por ejemplo, si la molécula se distribuye tanto en el tejido destinatario como en el tejido adyacente, esta molécula no es una buena candidata para un tratamiento dirigido que actúa específicamente/exclusivamente sobre dicho tejido destinatario.

35 Al comparar la distribución de la molécula de interés en el tejido destinatario con otro tejido no destinatario y/o la distribución de la molécula de interés con la distribución del control positivo, se puede evaluar la relación de penetración o la cantidad relativa de la molécula de interés en el tejido destinatario. La biodisponibilidad de la molécula de interés, sobre todo la proporción de dicha molécula que alcanza el tejido destinatario en comparación con la dosis administrada, también se puede valorar de un modo fidedigno con las técnicas de cuantificación absoluta que se conocen.

40 La invención también permite dar a conocer un coeficiente de selectividad de la molécula de interés por el tejido destinatario dado. Este coeficiente de selectividad tiene en cuenta la especificidad de la molécula de interés por dicho tejido diana y la relación de penetración de esta molécula en el tejido destinatario. Por lo tanto, se puede enumerar el coeficiente de selectividad por el tejido de varias moléculas, por ejemplo, las moléculas candidatas para un tratamiento terapéutico que actúan selectivamente sobre un tejido dado. Estos coeficientes de selectividad podrían compararse con rapidez para seleccionar la molécula candidata más adaptada.

45 El método de la invención también permite evaluar la cinética de la eliminación o el metabolismo de la molécula en dicho tejido. Con este propósito, las mismas moléculas (de interés y de control) se administran en las mismas dosis a varios animales idénticos en el mismo momento de partida ( $t_0$ ). Se sacrifican después los animales en diferentes tiempos ( $t_1$  a  $t_n$ ). A continuación, la distribución de la molécula de interés se compara directamente en los cortes de tejido del tejido destinatario muestreado de cada animal para tener acceso a la distribución escalable de la molécula de interés entre  $t_0$  y  $t_n$ .

Normalización de la señal

55 Durante un experimento de toma de imágenes por espectrometría de masas puede ser importante normalizar los espectros de masas relacionados con cada molécula para tener en cuenta el coeficiente de extinción del tejido (CET). Adicionalmente, puede ser útil una etapa de normalización para tener en consideración el efecto de la matriz

cuando, para visualizar las moléculas, se utilicen las imágenes por espectrometría de masas que requieren un compuesto de la matriz.

5 Más en concreto, una molécula dada a una concentración dada no emite una señal de la misma intensidad en función del tejido en el que se detecta. De igual forma, dos moléculas diferentes a una concentración idéntica en un tejido dado tienen diferente intensidad de señal. Según la naturaleza del tejido y/o la localización de la molécula en dicho tejido, se puede observar una pérdida o ganancia de intensidad de la señal de la molécula en comparación con su señal en un soporte de muestra inerte o con la señal de una molécula estándar. Este coeficiente de extinción del tejido se puede calcular para cada molécula (y para cada tejido destinatario) y, por consiguiente, se puede utilizar para ponderar la señal obtenida para cada molécula.

10 De igual forma, cuando el corte del tejido estudiado se cubre con un compuesto de matriz, puede inducir una pérdida de la intensidad de la señal relacionada con la molécula de interés. Para impedirlo, se puede calcular el coeficiente de extinción con respecto al efecto de la matriz y utilizarlo para ponderar la señal obtenida para cada molécula estudiada en el corte del tejido analizado.

15 Al tener en cuenta el CET y/o el efecto de la matriz y la correspondiente normalización de la intensidad de la señal, se pueden obtener señales fiables relacionadas con la concentración real de cada molécula, independientemente de la clase de tejido y/o del compuesto de matriz que se utilicen. Se puede realizar entonces una cuantificación directa de las moléculas a partir de los resultados normalizados de la espectrometría de masas.

20 En la solicitud de patente internacional WO 2012/126873 se describe un método para calcular el coeficiente de extinción de tejido y el coeficiente del efecto de la matriz. Además, describe cómo tener en cuenta estos coeficientes para la detección de una molécula dentro de un tejido. Este método se puede aplicar ventajosamente con el método de la invención para normalizar las señales obtenidas de la molécula de interés y los compuestos de control. Por lo demás, o además, se pueden utilizar otros métodos de cálculo que permiten tal normalización de los espectros de masas con respecto a la señal de las moléculas estudiadas.

25 Ventajosamente, la etapa de normalización de la señal se realiza antes de la comparación de la distribución de las moléculas.

#### Análisis de las imágenes de espectrometría de masas

El método de la invención puede aplicarse con facilidad con el experimento de toma de imágenes por espectrometría de masas. En este caso, se visualizan y se comparan la intensidad máxima, el área del máximo o la relación de la señal por el ruido entre cada molécula de interés y los compuestos de control.

30 La aplicación de la etapa de análisis de la distribución de la molécula de interés de acuerdo con la invención se ilustra más adelante, en términos generales, basándose en el uso de la EM sobre un corte de tejido que comprende el tejido destinatario y un tejido no destinatario adyacente que rodea dicho tejido. Se estudian las características espectrales, sobre todo la intensidad máxima de las tres moléculas de interés (M1, M2 y M3), así como de un compuesto de control positivo (M+) y de un compuesto de control negativo (M-).

35 a) Análisis de la distribución de la molécula de interés en el tejido destinatario

En la figura 1 se muestran de manera esquemática las intensidades obtenidas con la toma de imágenes por espectrometría de masas del tejido destinatario, para las tres moléculas de interés (M1, M2 y M3), y las moléculas de control M+ y M-. Estas intensidades reflejan su distribución en el tejido.

40 A partir de los datos espectrales visualizados directamente en los cortes de tejido, se puede confirmar la presencia o la ausencia de cada molécula de interés dentro del tejido destinatario. Además, comparando las características espectrales de las moléculas de interés y de los compuestos de control, es fácil confirmar si esta distribución es significativa o no.

45 Para simplificar los resultados, las diferentes áreas de tejido se definen como dos cuadrados concéntricos, en donde el tejido destinatario corresponde al cuadrado del centro (segunda columna de imágenes en la figura 1). Los valores indicados en los cuadrados pequeños sobre la imagen corresponden a los valores de intensidad normalizados de cada molécula. La media de estos valores normalizados se calcula para cada molécula, para el tejido destinatario (firma espectral global de la región T1) y para el tejido adyacente (firma espectral global de la región T-T1).

50 Para evaluar la eficacia de la acción de la molécula de interés sobre el tejido destinatario, su acción se pondera al tener en cuenta su presencia o ausencia en el corte del tejido que no es destinatario, a saber, el tejido adyacente denominado T. Para esto, se unen la intensidad media de la molécula de interés dentro y fuera del tejido destinatario con la intensidad media de los compuestos de control positivo y negativo en los mismos tejidos.

Tal y como se ilustra en la figura 1, la molécula M2 pone de relieve una intensidad alta en todo el tejido (tejido destinatario y tejido no destinatario) y es globalmente inespecífica del tejido destinatario T1. Por el contrario, la molécula M1 muestra una intensidad elevada únicamente en el tejido destinatario T1 y casi no se detecta en el tejido

adyacente T. Su distribución es más bien como la de la molécula M+.

5 Así pues, se puede evaluar un primer factor F1 representativo de la especificidad de la distribución de la molécula de interés en el tejido destinatario con el uso, como valor de referencia, de la intensidad normalizada de los máximos en los espectros de masas de cada molécula de interés, dentro y fuera del tejido destinatario, que se comparan con la intensidad normalizada de los máximos de los compuestos de control positivo y negativo dentro y fuera del tejido destinatario. Para simplificar el cálculo, el factor F1 del compuesto de control positivo se considera que es el 100% y el factor F1 del compuesto de control negativo es el 0%.

En la tabla 2 que viene a continuación recogen los resultados de la intensidad obtenidos para cada molécula.

Tabla 2: Resumen de los valores de intensidad media por molécula y área del tejido

Intensidad media			
	T1	T-T1	F1 (%)
M+	6,51	0,3	100%
M-	1,03	3,66	0%
M1	5,97	0,53	90%
M2	6,29	3,28	61%
M3	0,90	2,46	22%

10

El factor F1 permite clasificar las moléculas de interés según su especificidad por el tejido destinatario.

Basándose únicamente en este factor, ya se pueden ordenar las moléculas de interés según la especificidad por el tejido destinatario. Así pues, en el presente caso, la molécula M3, con menos del 25% de eficacia espectral, se puede eliminar de las moléculas candidatas para un tratamiento que tiene por destino el tejido T1.

15 b) Análisis de la parte de la molécula de interés en el tejido destinatario

De acuerdo con la invención, también se puede evaluar la proporción de la molécula de interés que alcanza el tejido destinatario con respecto a la dosis administrada y compararla con el compuesto de control positivo.

20 Más específicamente, tal y como se ilustra en la figura 2, el método de la invención permite evaluar las similitudes y disimilitudes de la distribución de la molécula de interés en comparación con el compuesto de control positivo en el tejido destinatario.

25 Se tienen en cuenta las similitudes espaciales de la distribución de las moléculas para evaluar la acción específica de cada una sobre el tejido destinatario. Por ejemplo, a partir del mapa de intensidades obtenido para cada molécula (columnas 1 y 2 en la figura 2), la desviación estándar, o la varianza, del valor de la molécula de interés se calcula en comparación con el valor del compuesto de control positivo para cada posición (a saber, para cada cuadrado que tiene una posición  $x_i, y_j$ ).

La desviación estándar se puede calcular según la ecuación matemática que viene a continuación:

$$\sigma_{Mi} = \sqrt{(X_{Mi} - \bar{X}_M)^2 + (X_{M+} - \bar{X}_M)^2}$$

$\sigma_{Mi}$ : Desviación estándar de la molécula de interés  $M_i$  en comparación con el marcador positivo  $M+$ .

$X_{Mi}$ : Valor de la intensidad de la molécula de interés  $M_i$  en las coordenadas  $(x_i, y_j)$ .

30  $X_{M+}$ : Valor de la intensidad del compuesto de control positivo  $M+$  en las coordenadas  $(x_i, y_j)$ .

$(\bar{X}_M)$ : Intensidad media de la molécula de interés y del compuesto de control positivo en las coordenadas  $(x_i, y_j)$ .

35 A partir de estos valores de desviación estándar, el método de la invención permite calcular un segundo factor F2 que pone de relieve la relación de penetración de la molécula de interés en el tejido destinatario. El factor F2 corresponde al porcentaje de similitud entre la distribución de la molécula de interés y el compuesto de control positivo ( $F2 = 100\%$ ). Hablando en términos generales, el factor F2 del compuesto de control negativo es el 0%. Al comparar la desviación estándar de la molécula de interés con el compuesto de control positivo (y finalmente del compuesto de control negativo), se puede evaluar el coeficiente de F2 para dicha molécula de interés.

En la figura 2 se describen estos valores del factor F2 obtenidos para cada molécula de interés M1, M2 y M3. Más

en concreto, este experimento permite ver que la molécula M1 muestra un porcentaje de recuperación elevado con el compuesto de control positivo M+. En cuanto a la molécula M2, incluso aunque la M2 se detecte en el área del tejido destinatario, no muestra una distribución parecida a la del compuesto de control positivo M+. Y la distribución de M3 es parecida a la del compuesto de control negativo. Su porcentaje de recuperación con M+ es casi cero.

5 c) Cálculo del coeficiente de selectividad de una molécula de interés por un tejido dado

De acuerdo con la invención, se puede calcular un coeficiente de selectividad de una molécula de interés dada por un tejido destinatario dado. Este coeficiente de selectividad refleja la especificidad de dicha molécula por dicho tejido, así como su distribución espacial (o relación de penetración) en dicho tejido.

10 Por ejemplo, el coeficiente de selectividad corresponde a la media de los valores obtenidos para los factores F1 y F2 para dicha molécula en dicho tejido.

El coeficiente de selectividad (o porcentaje de selectividad) para cada una de las moléculas de interés M1, M2 y M3 se describe en la tabla 3 que viene a continuación. Así pues, se pueden ordenar jerárquicamente las moléculas de interés según su acción más o menos eficaz y más o menos específica de dicho tejido.

15 Tabla 3: Resumen de los coeficientes de selectividad de las moléculas de interés y de los compuestos de control por el tejido destinatario T1

	F1 (%)	F2 (%)	% de selectividad
M+	100%	100%	100%
M-	0%	0%	0%
M1	90%	75%	83%
M2	61%	48%	54%
M3	22%	0%	11%

En el presente caso, la molécula M1 es el mejor candidato para el tejido destinatario T1 ya que tiene una acción más selectiva y específica que la molécula M2. La molécula M3, tal y como se valoró anteriormente, no es una buena candidata para el tejido T1.

20 **Ejemplos**

El método de la invención se describirá a continuación con más detalle mediante el uso de ejemplos específicos y las figuras presentadas más arriba. Estos ejemplos se dan sólo con el propósito de ilustrar y de ninguna manera pretenden restringir el alcance de la invención. Por supuesto, de una manera casi idéntica, se puede utilizar un dispositivo de toma de imágenes diferente al MALDI, tal como, por ejemplo, las siguientes fuentes: SIMS, DESI, DIOS, ICP, microscopio con MALDI, SNOM, SMALDI, LA-ICP, ESI (extracción líquida en el tejido), MILDI, JEDI, ELDI, etc.

Ejemplo 1: Evaluación de la fijación de la olanzapina en regiones histológicas del riñón

En el ejemplo 1, el método de la invención se utiliza para evaluar la distribución de la olanzapina en el riñón de ratón y para estudiar su acción selectiva sobre una región específica del riñón.

30 **Material y métodos**

Ácido hidroxicinámico (CHCA) de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, Francia).

Ácido trifluoroacético (TFA) de Sigma Aldrich.

Acetonitrilo/DMSO/Agua de Sigma Aldrich.

Olanzapina de Lilly Research Laboratories (Eli Lilly y Co, Indianápolis, IN).

35 Compuesto de control positivo: posaconazol de Sigma Aldrich.

Compuesto de control negativo: metsuximida de Sigma Aldrich.

Delimitación del tejido destinatario

El tejido destinatario, de aquí en adelante «tejido 1», comprende la médula y los cálices renales.

También se considera el tejido adyacente que no es destinatario, de aquí en adelante «tejido 2», y comprende la

región de la corteza renal.

Molécula de interés y selección de los compuestos de control positivo y negativo

La olanzapina es un fármaco que se utiliza en el tratamiento de determinadas formas de esquizofrenia y trastorno bipolar. Es uno de los antipsicóticos utilizados más habitualmente. Pertenece a la clase de las tienobenzodiazepinas.

5 La olanzapina ya se sabe que es una molécula que actúa selectivamente sobre el cerebro. Los estudios farmacocinéticos han demostrado que la olanzapina se absorbía rápidamente en el organismo y que se acumulaba sobre todo en el hígado, en el bazo o en el riñón. Además, la distribución de la olanzapina es muy específica de algunas clases de tejido dentro del mismo órgano y permite, por ejemplo para el riñón, una diferenciación prominente de la corteza y de la región de la médula. En este ejemplo, los inventores han estudiado las propiedades de selectividad por tejido que tiene la olanzapina dentro del riñón.

10 Dos compuestos de control positivo y negativo se seleccionan por sus propiedades para actuar selectivamente sobre los tejidos 1 y 2, respectivamente.

El posaconazol, que se sabe que se fija específicamente al tejido 1 y no al tejido 2, se elige como el compuesto de control positivo.

15 La metsuximida, que se sabe que se fija específicamente al tejido 2 y no al tejido 1, se elige como el compuesto de control negativo.

Preparación del animal

20 Se utilizaron ratones de tipo silvestre de la cepa Swiss de Charles River que pesan de 25 a 40 g. La olanzapina y los compuestos positivo y negativo captados en una solución de NaCl al 0,9% se administraron por vía oral a una concentración de 8 mg/kg. Se sacrificó el ratón por asfixia con CO<sub>2</sub>. A continuación, se retiraron los riñones y se sumergieron en una solución de isopentano al 100% enfriada con nitrógeno líquido para que la congelación fuera rápida. Finalmente, los riñones se conservaron a -80 °C.

Preparación de las muestras para la toma de imágenes por espectrometría de masas

25 El riñón se cortó en capas con un grosor de 10 µm (cortes sagitales) en un Microm HM560 (Thermo Scientific, Francia) enfriado a -21 °C. A continuación, los cortes se depositaron en placas conductoras de ITO (óxido de estaño e indio) (Delta Technology, EE. UU.). Finalmente, los cortes se mantuvieron en la cámara del criostato 30 min para el criosecado y luego se colocaron en un desecador durante 30 minutos.

30 Se utilizó una matriz de CHCA para el análisis de todos los cortes de los tejidos de riñón. Esta matriz se preparó a una concentración de 10 mg/ml en acetonitrilo/agua + TFA al 0,1% (6:1, v/v). La solución de la matriz se depositó mediante el sistema de pulverización SunCollect (SunChrom, Alemania) siguiendo el protocolo optimizado.

Adquisición de imágenes por MALDI

35 Las imágenes se obtuvieron en un espectrómetro de masas en MALDI-TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con un láser Smartbeam II. Los datos se generaron en un modo de reflectrón positivo. Se obtuvieron 500 espectros para cada depósito con una frecuencia de láser de 1000 Hz y una resolución espacial de imágenes de 200 × 200 µm<sup>2</sup> en un intervalo de masas de 100 a 1000 Da. Se utilizó el programa informático FlexImaging versión 4.0 para reconstruir las imágenes y el programa informático Quantinetix 1.6 (ImaBiotech, Loos, Francia) permite la extracción de la intensidad espectral de los iones que corresponden a cada molécula estudiada.

Localización de la molécula de interés y de los compuestos de control

40 Primero, es necesario realizar experimentos de toma de imágenes por espectrometría de masas para localizar los iones de interés dentro de los tejidos (figura 3).

Se consiguieron imágenes de todo el riñón. La resolución espacial utilizada fue de 200 µm, lo que permite distinguir con facilidad las subestructuras renales.

En la figura 3 se muestra un corte de tejido de riñón que pone de relieve sus diferentes áreas histológicas (figura 3A). Se han tomado cortes del centro del riñón.

45 A partir de esto, se puede observar con fidelidad el tejido destinatario. En especial, la figura 3B muestra la distribución solapante de los compuestos de control positivo y negativo, así como de la molécula de interés, la olanzapina. Se ve con claridad la distinción entre el tejido 1 (área central del corte de tejido) y el tejido 2 (área periférica del corte de tejido), tal y como se presenta en el esquema de la figura 3C.

50 Estos resultados permiten evaluar la eficacia de los compuestos de control positivo y negativo por la región histológica destinataria. También es importante poner de relieve la molécula de interés dentro del tejido, lo cual es el caso en el presente caso.

En la figura 4 se muestran tres espectros de masas que corresponden a las áreas histológicas de interés, el tejido 1 para el compuesto de control positivo (m/z 204, figura 4C), el tejido 2 para el compuesto de control negativo (m/z 725, figura 4B) y un área con la olanzapina muy concentrada (m/z 313, figura 4A).

Resultados

5 Cálculo del factor F1

Para calcular el F1 que está relacionado con la especificidad de la distribución espacial de la molécula de interés dentro del tejido destinatario, primero hay que extraer la intensidad de todas las moléculas de interés y de los compuestos de control desde la imagen por espectrometría de masas (imagen de EM).

10 La figura 5 permite visualizar por separado la distribución con respecto a los compuestos de control positivo y negativo, así como la olanzapina.

La representación policromada ofrece información relacionada con la intensidad relativa de los iones de interés. El valor máximo de cada escala es diferente y corresponde al valor más alto de intensidad de cada ion independiente en la imagen de EM.

15 Cada región histológica de interés está delimitada en las imágenes moleculares y se ilustra en la figura 4 y en la 5 con líneas discontinuas. El programa informático de tratamiento de datos de imágenes, Quantinetix, se utiliza para extraer la intensidad relativa de cada ion de interés y compuesto de control para cada posición (o voxel) en cada región extraída.

Las imágenes de EM de la figura 5 ilustran:

20 - La distribución del compuesto de control positivo (M<sup>+</sup>) a nivel del tejido destinatario 1 (imagen molecular a la izquierda);

- La distribución del compuesto de control negativo (M<sup>-</sup>) a nivel del tejido destinatario 2 (imagen molecular a la derecha);

- La distribución de la olanzapina a nivel del tejido destinatario T1 y del tejido no destinatario T2 (imagen molecular central).

25 La siguiente etapa es normalizar el conjunto de datos totales para compararlos. La intensidad más alta con respecto a cada ion se utiliza para normalizar la intensidad por posición. Se calcula la intensidad media normalizada para cada ion y tipo de tejido.

Por definición, se considera que el factor F1 del compuesto de control positivo es igual al 100%, mientras que el factor F1 del compuesto de control negativo es igual al 0%.

30 Los resultados obtenidos para la olanzapina se describen a continuación en la tabla 4.

Tabla 4: Resumen de la intensidad media y del valor del factor F1 por molécula y área de tejido.

	Intensidad normalizada media por tejido		F <sub>1</sub> (%)
	T1	T2	
M <sup>+</sup>	0,281	0,055	100%
M <sup>-</sup>	0,062	0,241	0%
M <sub>C</sub>	0,161	0,117	52,2%

T1: tejido destinatario; T2: tejido no destinatario; M<sub>C</sub>: olanzapina; M<sup>+</sup>: posaconazol; M<sup>-</sup>: metsuximida.

35 El factor F1 de la olanzapina refleja la eficacia promedio de la molécula escogida desde el punto de vista espectral y de la intensidad en los tejidos estudiados T1 y T2. Un valor de F1 del 50% describe un equilibrio global de la concentración relativa de la olanzapina en ambos tejidos en comparación con los compuestos positivo y negativo.

Cálculo del factor F2

La segunda etapa de la evaluación de la acción selectiva sobre tejidos tiene en cuenta el aspecto espacial de la distribución de la olanzapina en el riñón y lo compara con los compuestos de control.

40 El factor F2 permite comparar la distribución espacial de los compuestos de control con la molécula de interés, lo que proporciona información sobre sus similitudes o disimilitudes a nivel del tejido destinatario.

Para visualizar estas propiedades en las imágenes de EM, en la figura 6 se muestra el solapamiento de la distribución de la olanzapina y de los compuestos de control. Esto permite comparar la distribución de la olanzapina en el tejido destinatario (T1) con el tejido adyacente no destinatario (T2).

- 5 El cálculo del factor F2 se realiza con los valores de intensidad normalizados de la evaluación del factor F1 anterior. Posición por posición, se valora la desviación estándar del valor de intensidad de la molécula de interés y del control negativo con la del control positivo a nivel del tejido destinatario (T1). A continuación, se les calcula a la olanzapina y al compuesto de control negativo el valor medio de la desviación estándar.

Por definición, el factor F2 del compuesto de control positivo se considera igual al 100% mientras que el factor F2 del compuesto de control negativo es igual al 0%.

- 10 Tabla 5: Resumen de los valores de los factores F1 y F2 y del coeficiente de selectividad global (%Select) de cada molécula por el tejido destinatario.

T1	F1 (%)	F2 (%)	%Select
M <sup>+</sup>	100%	100%	100%
M <sup>-</sup>	0%	0%	0%
M <sub>C</sub>	52,2%	27%	40%

T1: tejido destinatario; Mc: olanzapina; M<sup>+</sup>: posaconazol; M<sup>-</sup>: metsuximida

- 15 El factor F2 para la olanzapina se evalúa al 27%, lo que refleja disimilitud con la distribución del control positivo en el tejido destinatario. Esto se pone de relieve sobre todo en la figura 6, donde la distribución de la olanzapina está localizada principalmente en la mitad derecha del corte de la médula renal (imagen central en la figura 6), mientras que el compuesto de control positivo está distribuido de forma homogénea en el tejido 1 (imagen derecha en la figura 6).

#### Resumen

- 20 La olanzapina muestra una afinidad media por la región de la médula renal. Los resultados obtenidos con el método permiten concluir que la olanzapina tiene un comportamiento medio de selectividad por una clase de tejido en el riñón en vez de otro, y se fija preferiblemente a una área limitada a la región de la médula renal.

#### Ejemplo 2: Cálculo de la adsorción

- 25 En la figura 7 se explica la metodología de la adsorción de una molécula en un tejido mediante el uso del ejemplo del proceso de ocupación del receptor. De este modo, se puede medir la eficacia que tiene el fármaco (agonista) por la ocupación del receptor cuando se le administra al animal en comparación con una molécula antagonista. En este ejemplo se describen todas las etapas de la metodología, el análisis solo del tejido que recibe la dosis, la etapa de lavado con la solución del antagonista del tejido de control y la combinación del análisis de dosificado/lavado en la muestra administrada. No se requiere ningún marcador negativo para esta clase de experimento.

- 30 En este ejemplo se evalúa la fijación competitiva de dos compuestos de tipo benzodiazepina, el diazepam (el agonista) y el lorazepam (el antagonista) que actúan selectivamente sobre el mismo receptor del cerebro (GABA). Está bien establecido que el lorazepam tiene una mayor afinidad por este receptor. Esta es la razón por la que el bien conocido lorazepam se utiliza para estudiar la afinidad y la eficacia que tiene el diazepam para fijarse a los receptores en el cerebro. La distribución del agonista (diazepam) y el antagonista (lorazepam) en un cerebro de una  
 35 rata se estudia mediante la toma de imágenes por espectrometría de masas de tipo MALDI. Por supuesto, de una manera casi idéntica se puede utilizar un dispositivo de toma de imágenes diferente al MALDI, tal como, por ejemplo, las fuentes siguientes: SIMS, DESI, DIOS, ICP, microscopio de MALDI, SNOM, SMALDI, LA-ICP, ESI (extracción de líquido en el tejido), MILDI, JEDI, ELDI, etc.

#### Material y métodos

- 40 Material

- Ácido 2,5-dihidroxi benzoico (DHB) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia).
- Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich).
- Metanol (Sigma-Aldrich).
- Diazepam (LGC Standard).

- 45 - Lorazepam (LGC Standard).

## Animales

Se utilizaron ratas de tipo silvestre que pesaban de 35 a 40 g. El diazepam captado en la solución de NaCl al 0,9% se inyectó por vía intravenosa a una concentración de 15 mg/kg. Los animales (ratas con dosis y de control) se sacrificaron por asfixia con CO<sub>2</sub>. A continuación, se les retiró el cerebro y se sumergieron en una solución de isopentano al 100% enfriada por nitrógeno líquido para la congelación rápida. Finalmente, los cerebros se conservaron a -80 °C.

## Preparación de muestras para la espectrometría de masas

El cerebro (tejidos de control y con dosis) se cortó en capas con un grosor de 10 µm (corte frontal) mediante el uso de un Microm HM560 (Thermo Scientific, Francia) enfriado a -20 °C. Los cortes se depositaron luego en placas de portaobjetos conductivos con ITO (óxido de estaño e indio) (Delta Technology, EE. UU.). Finalmente, los cortes se mantuvieron en la cámara del criostato durante 15 minutos para el criosecado y luego se colocaron en una desecadora durante 20 minutos.

## Etapas de lavado/incubación con la solución de antagonista

La solución de antagonista se preparó a partir de una solución concentrada de lorazepam a 1 mg/ml en metanol (100%). La concentración final de la solución del lavado se ajustó a 100 pmol/µl en metanol/agua + TFA al 0,1% (7:3). La concentración del antagonista es un factor crucial para la ocupación del receptor, lo que mejora la capacidad de fijación de la molécula. Se depositaron 20 µl de la solución en un punto del corte del tejido (una muestra con dosis y una de control) y a continuación se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una caja dentro de la incubadora Incu-line (VWR, Francia). También se colocó en la incubadora un corte de cerebro dosificado sin lavar.

Después de la incubación, los tejidos se lavaron en 2 etapas para retirar la molécula sin fijar del tejido, primero con una solución de metanol/agua + TFA al 0,1% (7:3) que corresponde a la solución de lavado del antagonista. Segundo, el tejido se lava tan solo con la solución de agua (10 ml) y a continuación se coloca en una desecadora durante 15 min.

## Preparación para la adquisición de imágenes tomadas por MALDI

Se utilizó una matriz de DHB para el análisis de todos los cortes de tejido encefálico con o sin el lavado con la solución de lorazepam. Esta matriz se preparó a una concentración de 40 mg/ml en metanol/agua + TFA al 0,1% (1:1, v/v). La solución de la matriz se depositó con el sistema de pulverización SunCollect (SunChrome, Alemania).

## Adquisición de imágenes por MALDI

Las imágenes se obtuvieron con un espectrómetro de masas de MALDI-TOF AutoFlex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con un láser Smartbeam. Los datos se generaron en el modo de reflectrones positivos. Se obtuvieron 700 espectros de cada depósito puntual con una frecuencia de láser de 1000 Hz y una resolución espacial de imágenes de 150 × 150 µm<sup>2</sup> en un intervalo de masas de 0 a 1000 Da. Se utilizó el programa informático FlexImaging versión 4.0 para reconstruir las imágenes.

## Resultados

En la figura 8 se muestran las imágenes obtenidas mediante MSI en las diferentes condiciones y siguiendo la metodología de evaluación de la adsorción.

El cerebro que recibió la dosis del agonista sin lavado pone de relieve una localización específica del diazepam (*m/z* 285) a nivel de la sustancia blanca del cerebro. La segunda etapa que implica el lavado de un corte de tejido de control con la solución de lorazepam permite observar el ion relacionado con el lorazepam (*m/z* 321) en el corte de cerebro, sobre todo en la sustancia blanca. Obviamente, no se observó ninguna detección del lorazepam ni del diazepam en el corte del cerebro con dosis y sin lavado, ni en el corte del cerebro de control con la etapa de lavado, respectivamente. Estos resultados ofrecen cierta información sobre los sitios de fijación del receptor de las dos especies de benzodiazepam, a saber, la sustancia blanca. Finalmente, el último experimento combina el tejido que recibe las dosis de diazepam con la etapa de lavado del lorazepam. Esta imagen se utiliza además para calcular la eficacia y la afinidad del diazepam de acuerdo con la respuesta del lorazepam.

En resumen, el experimento da a conocer:

- La distribución de la molécula escogida (Mc), el diazepam
- La distribución del marcador positivo (M+), el lorazepam
- El área destinataria (T1), la sustancia blanca (sitio de fijación del receptor) y el área no destinataria (T2), el resto del cerebro.

Factor F1; factor de intensidad

Para calcular el factor 1 que está relacionado con los parámetros espectrales de la molécula escogida a nivel del tejido destinatario, se necesita primero extraer la intensidad de los iones de diazepam y de lorazepam en el área específica del cerebro.

A continuación, se aplica la metodología para calcular el F1 en el conjunto de datos.

5 Tabla 6: Resumen de los valores medios de la intensidad y el factor F1 correspondiente por molécula y tejido

	Intensidad media normalizada/tejido		F <sub>1</sub> (%)
	T1	T2	
M <sup>+</sup>	0,821	0,21	100%
M <sub>c</sub>	0,692	0,117	85,1%

T1: área destinataria; T2: área no destinataria; Mc: diazepam; M+: lorazepam.

Factor F2; factor espacial

10 La segunda etapa de la valoración de la afinidad del diazepam tiene en cuenta su distribución espacial a nivel del área destinataria frente a la localización del marcador positivo. El factor F2 permite comparar la localización precisa del agonista y del antagonista en la región de la sustancia blanca y ofrece información sobre su similitud o disimilitud.

Tabla 7: Resumen de los valores de F1 y F2 y el correspondiente coeficiente de selectividad (%Select) para el diazepam en el área destinataria (receptor)

T1	F1 (%)	F2 (%)	%Select
M <sup>+</sup>	100%	100%	100%
M <sub>c</sub>	85,1%	72,5%	78,8%

T1: Área destinataria; Mc: diazepam; M+: lorazepam.

15

El factor F2 es igual al 72,5%, lo que se traduce en una alta similitud de la distribución del diazepam y del lorazepam en el área destinataria (sitio del receptor). El lorazepam está muy localizado en la sustancia blanca del cerebro, así como su antagonista, el lorazepam.

Conclusión

20 En conclusión, los dos factores se pueden combinar para estimar el factor de selectividad global del agonista tal y como se presenta en la tabla 7. El diazepam muestra una gran afinidad por el sitio del receptor de benzodiazepina con respecto al marcador positivo estudiado. La selectividad del diazepam es muy eficaz por la región de la sustancia blanca del cerebro.

25

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario, que comprende la visualización y la comparación mediante la toma de imágenes moleculares por espectrometría de masas de la distribución de la molécula candidata y de al menos un compuesto control en la superficie de al menos un corte de tejido destinatario anteriormente obtenido por muestreo en al menos un animal que ha recibido con anterioridad la molécula candidata, y optativamente el compuesto de control.
- 10 2. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el animal es un mamífero no humano.
- 10 3. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde al animal se le ha administrado con anterioridad un compuesto de control positivo y un compuesto de control negativo.
- 15 4. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al animal se le han coadministrado con anterioridad la molécula candidata y el compuesto de control.
- 15 5. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al animal se le ha administrado con anterioridad una misma concentración del compuesto de control y de la molécula candidata.
- 20 6. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula candidata y optativamente el compuesto de control han sido administrados al animal con anterioridad por vía enteral o parenteral.
- 20 7. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa de visualización de la distribución de la molécula candidata y del compuesto de control se consigue con el uso de imágenes por MALDI.
- 25 8. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las señales relacionadas con los espectros de masas de la molécula candidata y/o del compuesto de control se normalizan para tener en cuenta un coeficiente de extinción del tejido (CET) y/o un efecto de la matriz biológica.
- 30 9. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la especificidad de la molécula candidata por el tejido destinatario se valora al comparar la distribución de dicha molécula candidata en el tejido destinatario con la distribución de dicha molécula candidata en al menos un tejido que no es el destinatario.
- 35 10. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una relación de penetración de la molécula candidata por el tejido destinatario se evalúa al comparar la distribución de dicha molécula candidata dentro del tejido destinatario con la distribución del compuesto control dentro de dicho tejido destinatario.
- 40 11. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una etapa de evaluación de la cinética de la molécula candidata que compara la distribución de dicha molécula candidata en al menos dos cortes del tejido destinatario anteriormente obtenido mediante el muestreo en diferentes tiempos (t1) y (t2) de animales a los que se ha administrado con anterioridad la molécula candidata.
- 45 12. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula candidata es una molécula terapéutica o fitosanitaria en potencia o uno de sus metabolitos o una molécula diagnóstica en potencia.
- 45 13. Método para evaluar *ex vivo* o *in vitro* si una molécula candidata se fija o se incorpora en al menos un tejido destinatario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho animal o tejido destinatario o corte de tejido se trató con anterioridad para modificar su capacidad para fijar y/o incorporar la molécula candidata en el interior del tejido destinatario.
- 50 14. Un medio de datos legible por ordenador que comprende instrucciones ejecutables por ordenador idóneas para permitir que un sistema informático ejecute la comparación de la distribución de la molécula candidata con un compuesto control del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.



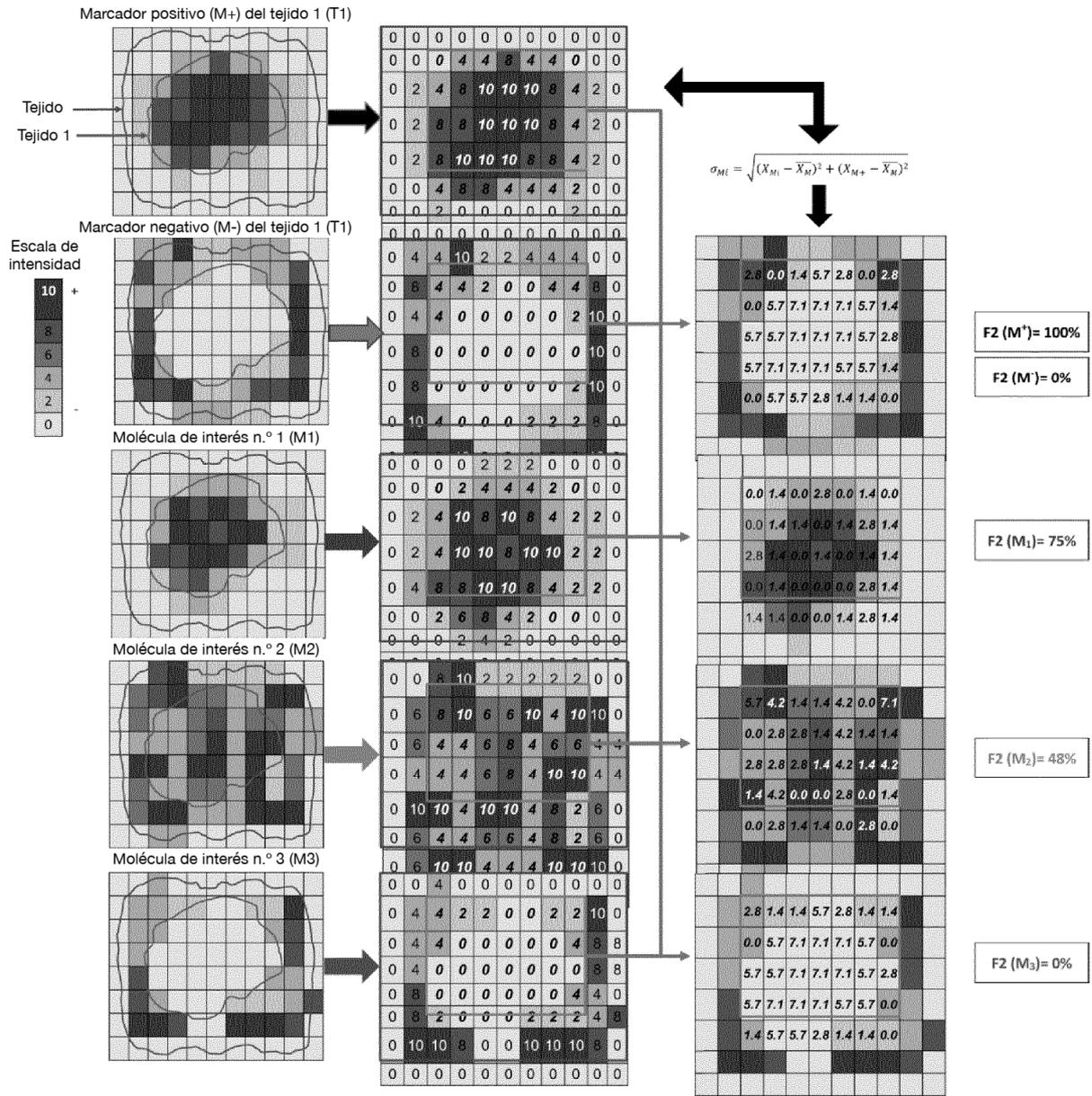


FIGURA 2

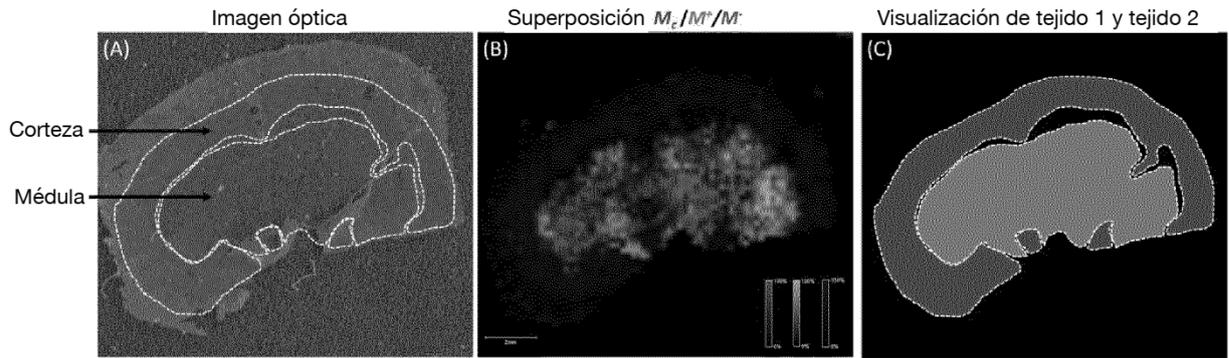


FIGURA 3

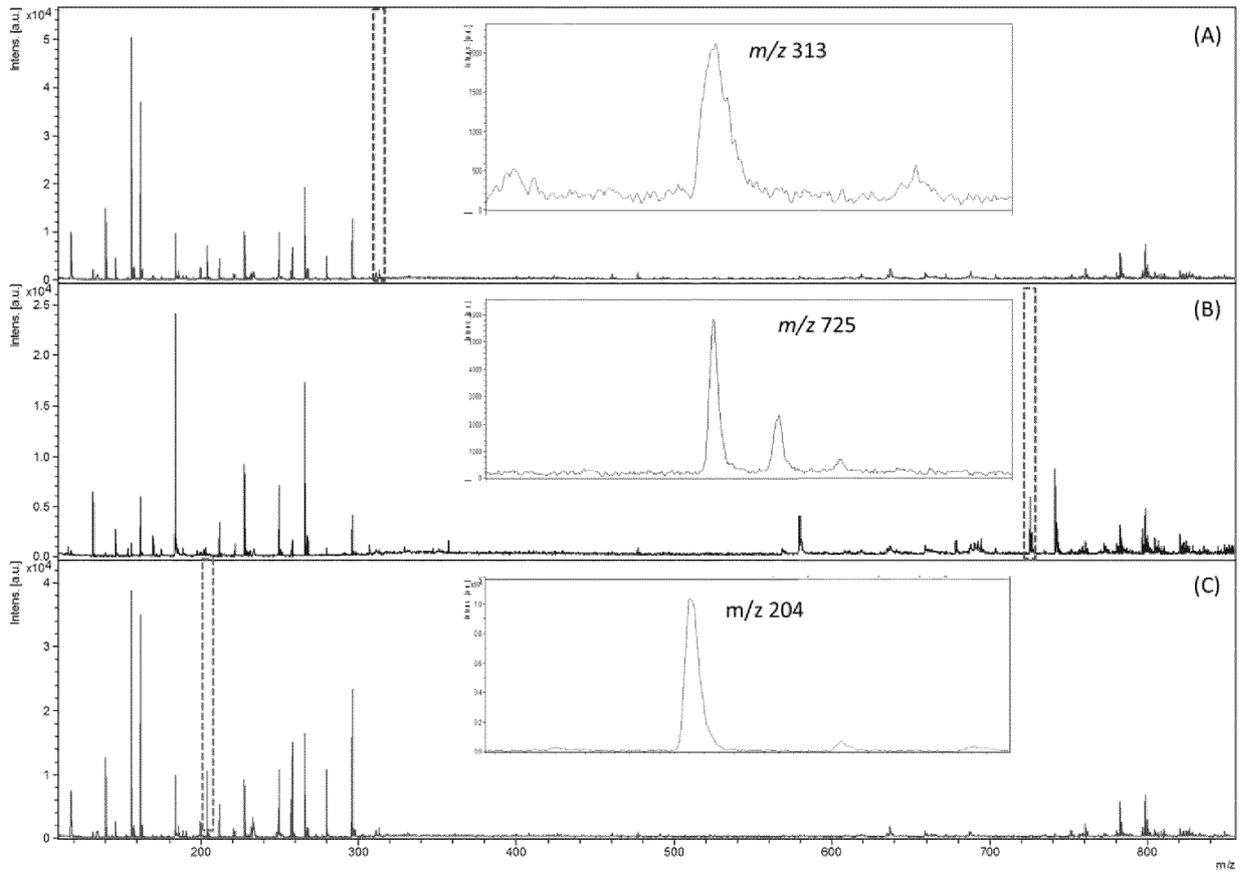


FIGURA 4

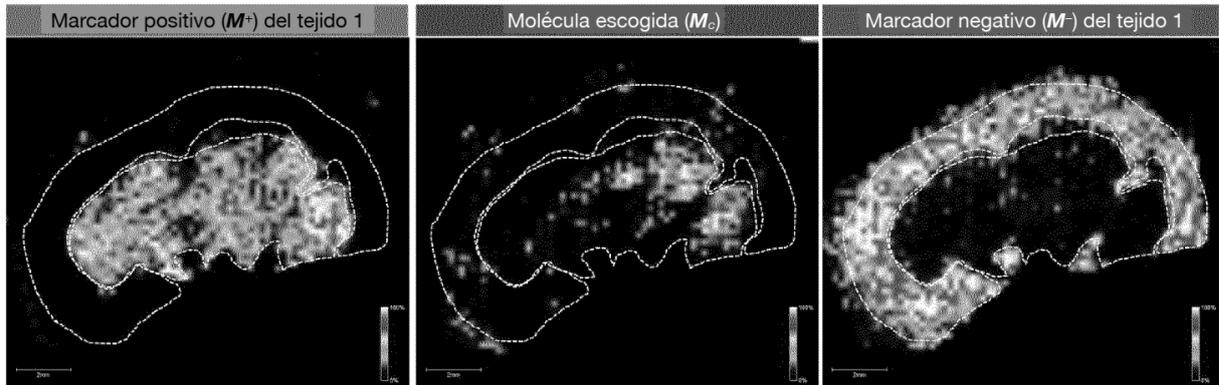


FIGURA 5

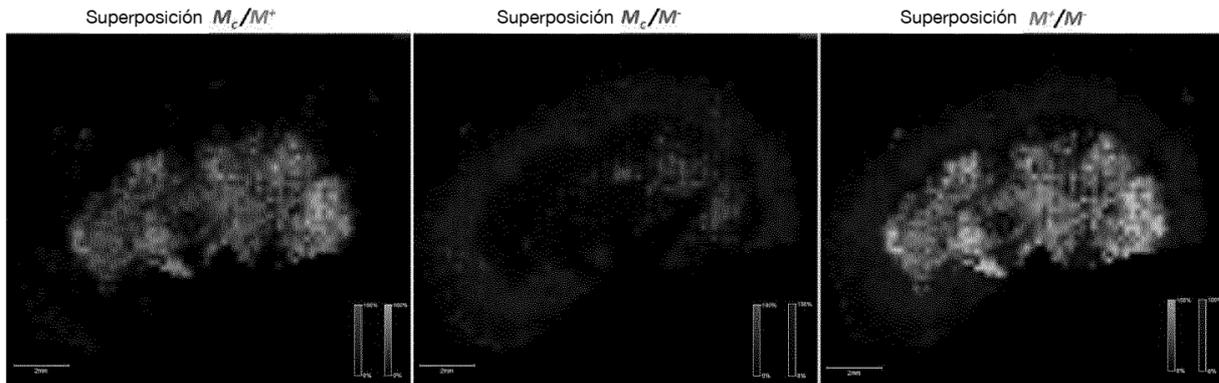


FIGURA 6

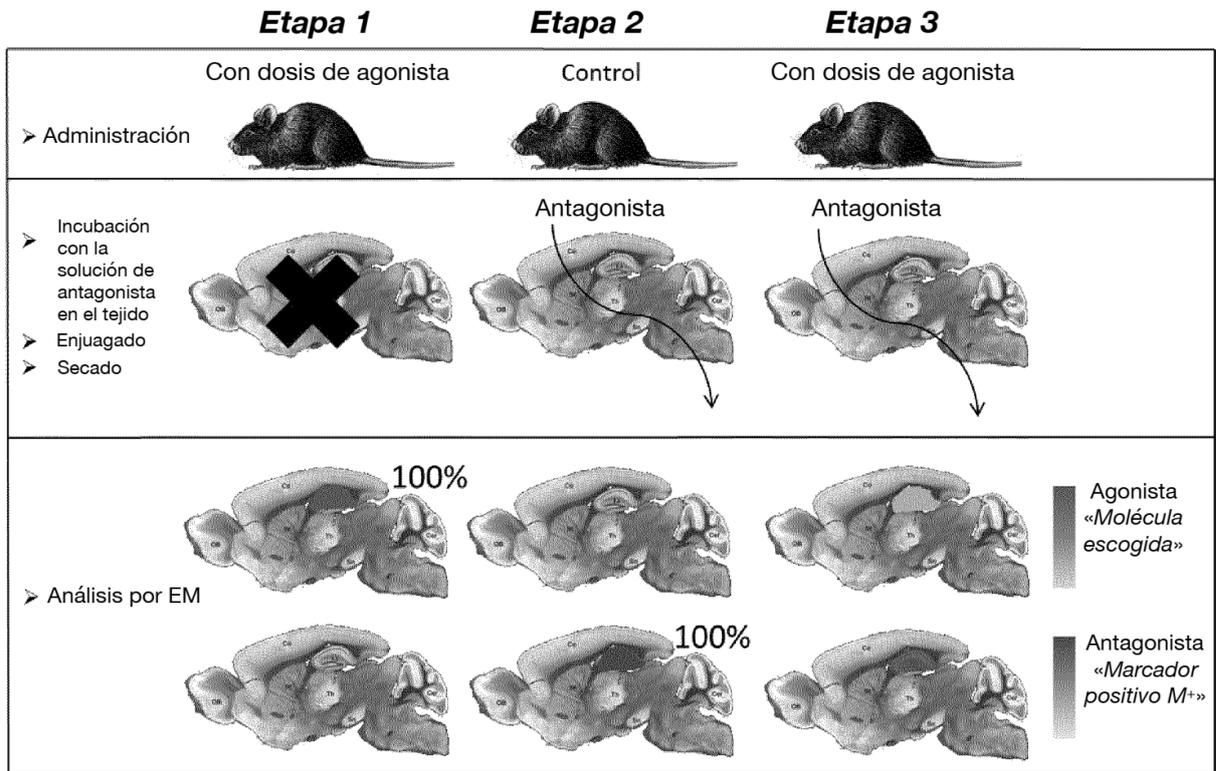


FIGURA 7

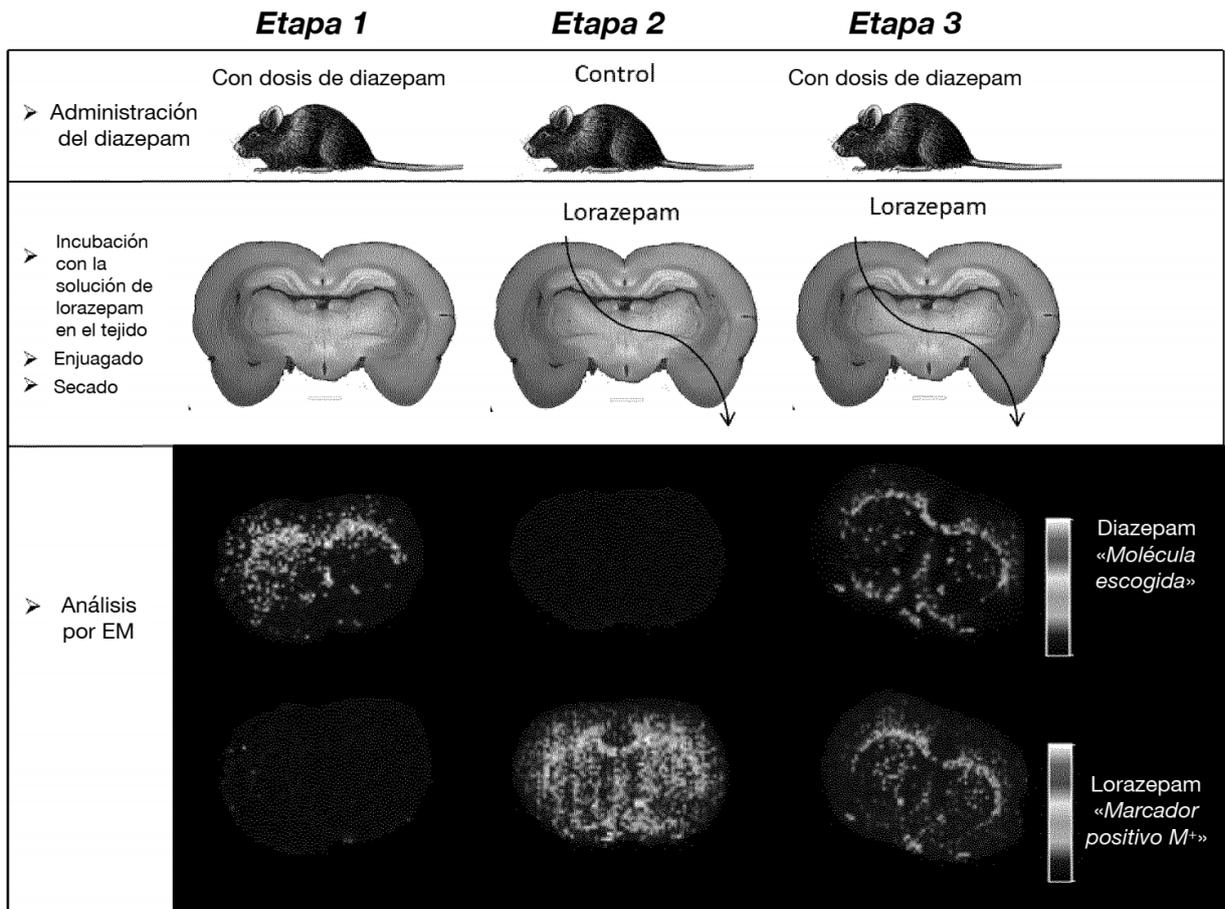


FIGURA 8