

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 648**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2012 PCT/EP2012/054768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12126873**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2012 E 12709114 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2689251**

54 Título: **Método para detectar y cuantificar una molécula diana en una muestra**

30 Prioridad:

21.03.2011 FR 1152334
27.09.2011 US 201161539681 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

73 Titular/es:

IMABIOTECH (100.0%)
152 rue du Docteur Yersin
59120 Loos, FR

72 Inventor/es:

STAUBER, JONATHAN;
PAMELARD, FABIEN;
BONNEL, DAVID y
HAMM, GRÉGORY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 745 648 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 detectar y cuantificar una molécula diana en una muestra

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método para detectar y cuantificar al menos una molécula diana en una muestra mediante espectrometría de masas. Más particularmente, la invención proporciona un método para detectar y cuantificar una molécula diana directamente en la superficie de una muestra utilizando obtención de imágenes por espectrometría de masas, en particular obtención de imágenes mediante desorción/ionización láserica asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés).

10 En general, se puede aplicar la invención en cualquier campo en el cual resulte útil o necesaria la cuantificación de una molécula en una muestra. Se puede aplicar la invención en el campo farmacéutico, por ejemplo, para estudiar la distribución y la farmacocinética de un fármaco en diversos tejidos biológicos. Además, se puede aplicar la invención en el campo de la química agrícola, especialmente para evaluar en plantas la toxicidad y la degradación de una molécula tal como un herbicida.

Estado de la técnica

15 La espectrometría de masas es una técnica ampliamente conocida y utilizada en análisis químicos y bioquímicos para detectar e identificar moléculas de interés en una muestra. En los últimos años se ha desarrollado la obtención de imágenes moleculares mediante espectrometría de masas, por ejemplo la obtención de imágenes mediante MALDI, que permite visualizar la distribución de moléculas de interés directamente en cortes de tejido biológico. Gracias a su alta sensibilidad, la obtención de imágenes mediante MALDI permite visualizar simultáneamente la
20 distribución de un número muy elevado de moléculas diferentes, directamente en la superficie de una muestra. En el campo farmacéutico, esta tecnología hace posible, por ejemplo, comparar la distribución de una molécula en diversos órganos a distintos tiempos durante un tratamiento.

25 Sin embargo, si se desea cuantificar en el tiempo "t" la molécula así detectada, es necesario combinar esta técnica de obtención de imágenes con el análisis químico cuantitativo a través de un método tradicional o instrumental. Este segundo paso de cuantificación puede constituir una fuente de errores de tratamiento y de interpretación. Además, no permite una correlación directa entre la presencia de la molécula de interés y su distribución cuantitativa en la muestra.

Descripción de la invención

30 La invención propone un método que utiliza en general espectrometría de masas, dentro de un único análisis, para detectar y cuantificar una molécula diana en una muestra de tejido biológico. El método de la invención utiliza obtención de imágenes por espectrometría de masas, lo que permite el registro automático de una señal relacionada con el espectro de masas de la molécula, directamente sobre la muestra, con el fin de reconstruir imágenes de la distribución y la cantidad al menos relativa de dicha molécula diana en la muestra.

35 Para ello, según la invención, se define y se integra en el método un coeficiente de extinción (TEC, por sus siglas en inglés) para la molécula diana, específico para cada molécula diana en una muestra dada. De hecho, una molécula dada, a una concentración determinada, no emite siempre una señal de la misma intensidad, sino que depende de la muestra en la que se detecta. Análogamente, dos moléculas diferentes, con una concentración idéntica en una muestra dada, presentan intensidades de señal diferentes. El cálculo y la integración del TEC permiten reconocer y tener en cuenta las variaciones de la intensidad de señal asociadas con el espectro de masas de la molécula diana
40 en la muestra a analizar. Después se puede utilizar el TEC para normalizar la señal obtenida para dicha molécula, de modo que sea representativa de su concentración, con independencia de la naturaleza de la muestra y de su ubicación en dicha muestra. De este modo, se posibilita la cuantificación directa de la molécula a partir de los resultados de espectrometría de masas obtenidos para la molécula diana en la muestra analizada.

45 Así pues, un objeto de la invención se refiere a un método para identificar y/o cuantificar mediante espectrometría de masas al menos una molécula diana en una muestra, según la reivindicación 1.

El método de la invención también es aplicable a cualquier tipo de soporte que se pueda utilizar en espectrometría de masas (portaobjetos, placa, membrana, etc.). Por lo tanto, el método es particularmente adecuado para el análisis de tejidos biológicos. En este caso se preparan cortes de tejido, típicamente con un grosor del orden de
50 varios micrómetros, y se depositan sobre un soporte, por ejemplo un portaobjetos, que permita introducirlos en el espectrómetro de masas.

Durante el paso a) se puede depositar la muestra mediante cualquier técnica conocida, es decir, manualmente (por ejemplo, con una pipeta) o automáticamente (utilizando un aparato de aplicación en puntos, o mediante pulverización o sublimación, por ejemplo). Se puede diluir la muestra o tratarla antes de depositarla sobre el soporte para muestras.

El paso b) del análisis de la molécula diana se puede realizar mediante cualquier método de espectrometría de masas, en particular utilizando espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) directa o espectrometría de masas en tándem (MSⁿ, MRM, SRM).

5 Se fijan ventajosamente los parámetros experimentales, tales como el intervalo de masas y/o la intensidad del láser, a fin de optimizar la detección de la molécula diana en términos de intensidad, sensibilidad y resolución.

Después se registran los espectros de masas.

Para el paso c), se pueden utilizar como señal diversas características espectrales, en particular la intensidad de los picos del espectro de masas, la relación señal/ruido (S/R), el área del pico, etc.

10 Un paso importante del método radica en la normalización de la señal medida. Para ello se pondera, mediante un coeficiente de extinción (TEC) específico para la molécula y la muestra, la característica espectral elegida como señal para la molécula diana en la muestra. Esta ponderación normaliza la señal y la hace depender exclusivamente de la cantidad de molécula en el origen de la señal.

15 El TEC es representativo de la disminución o aumento de la intensidad de la señal de la molécula diana en función de la naturaleza de la muestra y/o de su ubicación en la muestra, si se compara con la señal de dicha molécula sobre un soporte inerte para muestra o con la señal de un molécula patrón. El TEC depende de varios factores, en particular del origen de la muestra (animal, vegetal, bacteriano, inorgánico), del tipo de superficie (tejido, célula vegetal, metales, etc.), del entorno químico, de si se ha realizado o no tratamiento químico de la muestra, etc. En el caso de una muestra de tejido biológico, el coeficiente de extinción de la molécula corresponde al coeficiente de extinción del tejido.

20 Ventajosamente, se lleva a cabo un estudio preliminar histológico, químico o de otro tipo, de la muestra, con el fin de definir diversas zonas de interés y utilizarlas en el cálculo del TEC. De hecho, se puede vincular el TEC a una zona específica de una muestra, en particular en una muestra heterogénea.

El TEC se obtiene mediante la siguiente relación:

$$\text{TEC} = \frac{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en un medio de referencia correspondiente a un soporte para muestras solo}}{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en una muestra de tejido testigo}}$$

25 o

$$\text{TEC} = \frac{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en una muestra de tejido testigo}}{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en un medio de referencia correspondiente a un soporte para muestras solo}}$$

La señal corresponde a la característica espectral del espectro de masas de la molécula diana seleccionada, por ejemplo la intensidad del pico de dicha molécula, obtenida en el espectrómetro de masas. Obviamente, la característica espectral utilizada para la molécula en el medio de referencia y en la muestra debe ser la misma.

30 El TEC se calcula utilizando la misma concentración de la molécula diana en un medio de referencia y en la muestra a analizar. También es posible emplear, en lugar de la molécula diana en un medio de referencia, una molécula relacionada que tenga propiedades fisicoquímicas similares a las de la molécula diana.

35 Para calcular este TEC, el medio de referencia corresponde ventajosamente al soporte para muestras solo. Para ello, por ejemplo se solubiliza la molécula en un medio adecuado (disolvente orgánico, agua u otro) antes de depositarla sobre el soporte para muestras. La deposición va seguida de la evaporación del disolvente, de forma que se obtiene un depósito seco de la molécula sobre dicho soporte. La señal obtenida para dicha molécula en el soporte para muestras es lo que luego se utiliza para el TEC.

Generalmente, para obtener un coeficiente fiable, el valor del TEC es la media de varias mediciones de la molécula diana en las mismas condiciones.

40 Preferiblemente, el coeficiente de extinción (TEC) se calcula solamente una vez para una molécula diana dada en un tipo de muestra dado, y se reutiliza para cada análisis de dicha molécula diana en el tipo de muestra dado. Por lo

tanto, ventajosamente se puede crear para una molécula diana dada una base de datos de coeficientes TEC, que contenga los TEC de una molécula diana en varias muestras diferentes, y utilizarla en cada análisis de dicha molécula en muestras diversas.

Como alternativa, se puede determinar el valor del TEC antes de cada análisis.

- 5 La solicitud también describe un TEC obtenido mediante la siguiente relación:

$$\text{TEC} = \frac{\text{Señal de una molécula patrón en la muestra}}{\text{Señal de la molécula diana en la muestra}}$$

o, a la inversa:

$$\text{TEC} = \frac{\text{Señal de la molécula diana en la muestra}}{\text{Señal de una molécula patrón en la muestra}}$$

- 10 La señal corresponde a la característica espectral del espectro de masas de la molécula seleccionada, por ejemplo la intensidad del pico de dicha molécula obtenido en el espectrómetro de masas. Obviamente, la característica espectral utilizada para la molécula patrón y la molécula diana debe ser la misma.

- 15 En el contexto de la descripción, "molécula patrón" se refiere a una molécula estructuralmente similar a la molécula diana. Preferiblemente, el peso molecular de la molécula patrón es distinto al peso molecular de la molécula diana, de forma que se puedan analizar fácilmente los espectros de masas obtenidos. Por ejemplo, el peso molecular de la molécula patrón difiere en una cuantía de 1 a 17 daltons, del peso molecular de la molécula diana. Ventajosamente, la concentración de la molécula patrón, tomada en una solución solubilizante (acuosa o con contenido de un disolvente), está definida con vistas a no saturar la señal total.

- 20 En una realización particular, la molécula patrón es una molécula deuterada de la molécula diana, es decir, una molécula marcada con deuterio, o bien una molécula marcada con cualquier otro isótopo adecuado, en calidad de molécula patrón. Se evalúan simultáneamente, en la muestra analizada, la molécula diana y su complemento deuterado (o la correspondiente molécula marcada con un isótopo). Considerando que su ionización será idéntica, su análisis mediante espectrometría de masas dará como resultado la misma señal, con una diferencia de masa debida a la presencia del isótopo. Puesto que la concentración de la molécula marcada con el isótopo es conocida, se puede calcular la relación, con el fin de proporcionar una cantidad relativa.

- 25 Ventajosamente, antes del paso b) del análisis se añade a la muestra a analizar una concentración conocida de la molécula patrón, cuyo peso molecular también es conocido. Cuando el método de la invención utiliza una técnica de obtención de imágenes por espectrometría de masas que requiere el uso de una matriz, tal como la MALDI o la obtención de imágenes por espectrometría de masas de ion secundario intensificada por matriz (ME-SIMS, por sus siglas en inglés), se puede añadir la molécula patrón a la matriz antes de su uso. Se deposita uniformemente la mezcla de matriz y molécula patrón sobre la muestra, así como en la periferia de la muestra, es decir, sobre el soporte de la muestra, para permitir el cálculo del TEC. Durante el secado, se puede observar a simple vista la cocrystalización de la mezcla.

Preferiblemente, se homogeneiza la mezcla antes de depositarla.

- 35 También se puede emplear este TEC, que utiliza una molécula patrón, con técnicas de obtención de imágenes que no requieren una solución de matriz, tales como la desorción/ionización láserica (LDI, por sus siglas en inglés), ionización por electroespray con desorción (DESI), ionización por electroespray con ablación láserica (LAESI) o espectrometría de masas de ion secundario (SIMS). En tal caso, se puede depositar la molécula patrón sobre la muestra y el soporte, sin mezclarla con la matriz, utilizando el mismo dispositivo de deposición. Por lo tanto, la muestra queda impregnada con la molécula patrón que se puede utilizar como referencia para el estudio.

- 40 Se utiliza la señal obtenida para la molécula patrón, cuya concentración es conocida, para normalizar las características espectrales de la molécula diana con el fin de obtener una visualización real de la distribución de la molécula diana teniendo en cuenta el efecto de supresión. Además, la señal obtenida para la molécula patrón se puede utilizar para deducir al menos la cantidad relativa de la molécula diana en la muestra, comparando la señal de la molécula diana con la señal de la molécula patrón. También es posible compensar el efecto de la matriz, como se describirá con más detalle en lo que sigue.

Durante el paso d) se utiliza la señal ponderada medida en la muestra para cuantificar dicha molécula. La señal ponderada corresponde a la intensidad de señal obtenida para la molécula diana, aumentada o disminuida en función del TEC calculado correspondiente. Más exactamente, la señal ponderada corresponde a la relación entre la señal de la molécula diana en la muestra y el TEC asociado, o a la inversa.

- 50 El valor de la señal ponderada depende únicamente de la concentración de la molécula. Así es posible, por ejemplo, determinar la cantidad de molécula diana remitiéndose a una señal de referencia para la molécula diana.

La expresión "señal de referencia para la molécula diana" se refiere a una señal representativa de una concentración conocida, independiente de la naturaleza de la muestra y de su posición en la muestra. La señal de referencia puede ser un valor medio o de mediana (o un intervalo de valores medios o de mediana) previamente determinado o establecido para una cantidad conocida de una molécula dada. También puede tratarse de una curva estándar.

- 5 Dependiendo del método elegido y, si fuera necesario, de la señal de referencia utilizada, es posible determinar la cantidad de molécula diana de una manera relativa o absoluta.

10 Por ejemplo, la señal de referencia se obtiene preparando un abanico de patrones con al menos tres concentraciones conocidas distintas de la molécula diana (o de otra molécula con propiedades fisicoquímicas similares a las de la molécula diana), en un medio de referencia tal como un soporte para muestras sobre el cual se ha depositado la molécula solubilizada. Si se ha depositado la molécula sobre una muestra de tejido, ventajosamente la molécula se adsorbe sobre dicho tejido después de la deposición y evaporación del medio solubilizante.

15 Se puede introducir en el abanico de patrones un patrón interno, distinto de la molécula diana, con el fin de normalizar la señal de dicha molécula diana. Ventajosamente, la molécula utilizada como patrón interno tiene propiedades fisicoquímicas similares a las de la molécula diana. Antes de la deposición se añade una concentración constante de este patrón al abanico de patrones de la molécula diana.

20 A continuación, se analiza el espectro de masas para cada concentración. Se lee para cada una de dichas concentraciones la característica espectral elegida como señal de comparación. Ventajosamente, después de obtener los espectros de masas para cada punto de concentración, se puede utilizar la característica espectral asociada elegida, a fin de establecer una curva de calibración para dicha molécula. Entonces es suficiente remitirse a esta curva de calibración para determinar con exactitud la concentración en la muestra analizada.

25 El método de la invención se utiliza con la obtención de imágenes mediante espectrometría de masas. Es posible emplear diversas fuentes de ionización tales como MALDI, desorción/ionización láserica (LDI), ionización por electroespray con desorción (DESI), etc., combinadas con diversos tipos de analizadores tales como los de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés), orbitrap, resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier (FT-ICR), etc. Esta técnica de obtención de imágenes permite cuantificar directamente la molécula diana en el mapa de densidad iónica obtenido para la muestra, correspondiente a la distribución espacial de la molécula diana en dicha muestra. Así, se puede comparar la señal ponderada en dicho mapa de densidad iónica con una señal de referencia específica de la molécula de interés.

30 Algunas técnicas de obtención de imágenes mediante espectrometría de masas, tales como MALDI o ME-SIMS, requieren cubrir previamente la muestra a analizar con una matriz que comprende pequeñas moléculas orgánicas que absorben en UV. Esta matriz permite la desorción y la ionización de las moléculas presentes en la muestra.

35 El método de la invención se puede utilizar con independencia de la matriz elegida. Estas matrices se procuran en forma sólida (cristalización sobre la muestra) o en forma líquida, y son iónicas o no iónicas. La matriz se elige en función del intervalo de masas analizado. Por lo general se preparan inmediatamente antes de su uso en una mezcla disolvente/solución acuosa.

40 Son posibles varios métodos para depositar la matriz, en particular la deposición manual mediante una pipeta, que permite depositar un volumen preciso de matriz directamente sobre la muestra. También es posible depositar la matriz mediante rociadura o nebulización, en donde se rocía o se nebuliza directamente la matriz sobre el tejido mediante un sistema robótico o bien manualmente. De manera similar, se puede prever la deposición mediante microgotas, en donde aplica la matriz en puntos sobre la muestra por medio de sistemas piezoeléctricos, acústicos o con bomba de jeringa. También es posible depositar la matriz por tamizado, a fin de depositar la matriz en forma sólida.

45 Ventajosamente, si el método de la invención utiliza obtención de imágenes por espectrometría de masas MALDI, se puede esperar un paso de evaluación de la homogeneidad del depósito de matriz sobre la muestra. De hecho, la señal correspondiente a la matriz utilizada puede indicar la calidad o uniformidad del depósito de dicha matriz. Los defectos de la matriz sobre la superficie de la muestra pueden correlacionarse después con la ausencia de detección o la pérdida de intensidad de la señal de la molécula diana en la muestra estudiada.

50 Se puede evaluar la homogeneidad de la matriz en función de criterios cualitativos, observando bajo un microscopio óptico la homogeneidad del depósito sobre la superficie de la muestra, y/o en función de criterios cuantitativos, detectando variaciones en la señal con relación a la propia matriz sobre la muestra.

En cuanto a los criterios cualitativos, debe garantizarse que la matriz se haya depositado de la manera lo más uniformemente posible sobre la superficie en estudio y que no haya zonas desprovistas de matriz, y que su cristalización sea óptima.

55 Para evaluar cuantitativamente la homogeneidad del depósito de matriz, se considera a la matriz como una molécula en sí misma, cuya señal durante el análisis de la muestra se detecta de la misma manera que la señal de la

molécula diana. Después se compara la señal de la molécula matriz con su señal de referencia. La señal de referencia de la matriz corresponde en este caso a la señal emitida por la matriz sobre un depósito de matriz de referencia, es decir, sobre una muestra y sobre un soporte para muestras utilizados específicamente para medir la señal de referencia de la matriz.

- 5 Mediante estos pasos adicionales se valida la señal de la molécula diana y se normaliza para tener en cuenta la variación en la calidad de la deposición de la matriz, que puede afectar a las características espectrales del depósito de matriz.

Esta consideración del efecto de la matriz puede resultar particularmente ventajosa cuando se desea controlar los cambios a lo largo del tiempo en presencia de una molécula diana, ya que la calidad del depósito de matriz puede variar de una muestra a otra.

El método de la invención se puede utilizar para analizar cualquier tipo de molécula, por ejemplo péptidos, polipéptidos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos, etc., y en general cualquier molécula que sea activa farmacéuticamente o de cualquier otra manera, y que pueda ser ionizada mediante espectrometría de masas. El método de la invención es particularmente ventajoso para el análisis de moléculas pequeñas (especialmente fármacos), es decir, moléculas de peso molecular inferior a 2.000 Da.

Si la molécula diana es una proteína de alto peso molecular, es posible pretratar enzimáticamente y/o químicamente la molécula diana con el fin de escindirla en varios péptidos (Figura 2). Después se llevan a cabo la detección y la cuantificación para al menos uno de los péptidos representativos de dicha proteína, resultantes de la digestión enzimática y/o la degradación o modificación químicas. Por ejemplo, se puede emplear tripsina como enzima para escindir la proteína diana en varios péptidos previamente identificados. El pretratamiento químico puede consistir en hidrólisis química, por ácidos o bases, una reacción de Maillard, la formación de isopéptidos o lisinoalanina, etc.

Análogamente, es posible tratar la muestra a analizar con al menos un solvente y/o al menos un detergente antes del paso b) de detección, a fin de optimizar la detección de la molécula diana. Por ejemplo, el lavado con cloroformo (Figura 1-a) elimina ciertas clases de lípidos. El lavado con etanol (Figura 1-b) permite una mejor detección de moléculas de masa baja. Estos dos lavados, en el experimento ilustrado en la Figura 1, eliminan ciertas moléculas, en particular lípidos, favoreciendo así la detección de nuevos iones directamente sobre el tejido.

También se puede utilizar el método de la invención para detectar y cuantificar al menos dos moléculas diana diferentes en la misma muestra, de manera simultánea o secuencial.

El método de la invención es particularmente adecuado para detectar y cuantificar moléculas diana en un corte de tejido biológico, vegetal o animal. En especial, el análisis de un corte de animal entero puede permitir comparar, en la misma muestra, la distribución de moléculas diana en distintos tejidos de dicho animal.

Según la invención, se pueden normalizar con vistas a la cuantificación los datos de origen, es decir, el TEC de la molécula diana y el efecto de la matriz, por medio de un programa informático que integre todos o parte de estos factores. Este programa informático, o *software* para análisis de datos, utiliza ventajosamente el valor TEC ponderado, en caso necesario, por el efecto de la matriz durante el procesamiento de la imagen en el caso de la obtención de imágenes por espectrometría de masas.

Por consiguiente, otro objeto de la invención se refiere a un medio para datos legible por ordenador, que comprende instrucciones ejecutables por ordenador tales como, por ejemplo, la lectura de datos brutos resultantes del análisis por espectrometría de masas y/o la determinación de coeficientes TEC y/o la determinación de la curva de calibración, y/o la normalización de los datos brutos utilizando dichos TEC o dicha curva de calibración, para obtener un valor cuantitativo de la molécula diana. Convenientemente, estas instrucciones ejecutables por ordenador son adecuadas para permitir que un sistema informático ejecute al menos el paso c) del método de la invención.

El medio para datos comprende ventajosamente al menos una base de datos de TEC para al menos una molécula diana en al menos dos tipos distintos de muestra. Preferiblemente, en el caso de muestras biológicas, tales como un corte de animal entero, la base de datos enumera los TEC de al menos una molécula diana en diversos tejidos de dicha muestra.

El medio para datos también puede comprender una base de datos de la señal de referencia de al menos una matriz utilizada en obtención de imágenes por espectrometría de masas. Así, mediante el uso de un método de obtención de imágenes que utiliza el medio para datos, es posible tener en cuenta el efecto de la matriz durante el análisis de la muestra.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ejemplos del efecto de dos lavados en el análisis directo de tejido cardíaco mediante espectrometría de masas. (a): Señal obtenida del tejido cardíaco sin ningún lavado previo a la deposición de la matriz. (b): Señal obtenida del tejido cardíaco en un corte adyacente a (a), utilizando un lavado con etanol al 90% antes de la deposición de la matriz. (c): Señal obtenida del tejido del estómago en un corte adyacente a (a) utilizando un lavado

con cloroformo al 100% antes de la deposición de la matriz.

Figura 2. Espectro de masas MALDI-TOF de una proteína modelo digerida (albúmina sérica de bovino con tripsina como enzima de digestión) en (a) un soporte de referencia (portaobjetos) y (b) tejido (hígado de rata). Ejemplo del fragmento con m/z 928 (YLYEIAR): observación de la extinción de las señales másicas relativas al péptido en el tejido, con TEC igual a 1,62.

Figura 3. Una representación esquemática de los principales pasos del método de la invención, según un ejemplo de implementación que utiliza obtención de imágenes mediante espectrometría de masas.

Figura 4. Metodología para calcular el coeficiente de extinción tisular en el estudio de la distribución de propranolol en el cuerpo entero de ratones. (a) Imagen óptica de un corte sagital del ratón testigo para visualizar diversos órganos o zonas diana (1-portaobjetos solo, 2-cerebro, 3-riñón, 4-pulmón, 5-hígado, 6-corazón). (b) Imagen mediante espectrometría de masas de la distribución del patrón interno (propranolol, ion $[M+H]^+$ a m/z 260) mezclado con la matriz, sobre la muestra y separado de la misma, y escala de intensidades.

Figura 5. Metodología para calcular el coeficiente de extinción tisular de propranolol en el riñón. Figura 5A: Imagen óptica del riñón, delimitación de varias regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) o zonas de puntos con las mismas dimensiones, dentro del órgano diana. Figura 5B: Tabla de intensidades medias del patrón interno por cada ROI y entre ROI (media de la ROI).

Figura 6. Figura 6A: Tabla que resume las intensidades de propranolol por órgano o por zonas diana. Figura 6B: Histograma de intensidades de propranolol por órgano o por zonas diana.

Figura 7. Cálculo del coeficiente de extinción tisular. Figura 7A: Relación matemática: Tabla que resume los TEC calculados para propranolol por cada órgano diana. Figura 7B: Histograma de valores de TEC calculados para propranolol por cada órgano diana.

Figura 8. Determinación de la curva de calibración para la molécula diana. Figura 8A: Imagen óptica de deposiciones del abanico de patrones. Figura 8B: Imagen por espectrometría de masas de la distribución, en el abanico de patrones, de la molécula diana.

Figura 9. Figura 9A: Tabla que resume las intensidades medias por cada ROI del abanico de patrones de la molécula diana. Figura 9B: Gráfico de la línea de calibración. Figura 9C: Coeficiente de correlación y ecuación de la recta.

Figura 10. Cuantificación en la imagen por espectrometría de masas de la molécula diana (propranolol), en un cuerpo entero. Figura 10A: Imagen óptica de un corte sagital de ratón, transcurridos 20 minutos desde la inyección de la molécula diana y visualización de diversos órganos o zonas diana (2-cerebro, 3-riñón, 4-pulmón, 5-hígado, 6-corazón). Figura 10B: Imagen por espectrometría de masas de la distribución a $t = 60$ min después de la inyección de la molécula diana (ion $[M+H]^+$ a m/z 260), por intensidades. Figura 10C: Imagen por espectrometría de masas de la distribución a $t = 20$ min después de la inyección de la molécula diana, tras normalización según el TEC y correlación con la línea de calibración, proporcionando la cantidad por unidad de área de la molécula diana.

Figura 11. Cuantificación en la imagen MS de la molécula diana, tabla que resume la cantidad de molécula diana en los diversos órganos. Explicación de la metodología para calcular esto último a partir de las intensidades medias por órgano y píxel, utilizando el TEC.

Figura 12. Metodología para calcular el coeficiente de extinción tisular de olanzapina en el riñón. Figura 12A: Imagen óptica de un corte sagital del riñón del ratón testigo. Figura 12B: Imagen por espectrometría de masas de la distribución del patrón interno (olanzapina, ion $[M+H]^+$ a m/z 313,3) mezclado con la matriz, en la muestra y separado de la misma, y escala de intensidades. Figura 12C: Histograma del TEC calculado para olanzapina en el riñón.

Figura 13. Determinación de la curva de calibración para la molécula diana. Figura 13A: Imagen por espectrometría de masas del abanico de patrones, distribución de la molécula diana. Figura 13B: Representación de la recta de calibración relativa a la imagen MS de olanzapina, su ecuación, su coeficiente de correlación y sus límites de detección y de cuantificación en fmol/mm^2 .

Figura 14. Cuantificación por medio de la imagen mediante espectrometría de masas de la molécula diana (olanzapina), en un riñón tratado durante 2 horas. Figura 14A: Imagen óptica de un corte sagital de riñón de ratón a las 2 horas después de la administración de la molécula diana. Figura 14B: Imagen por espectrometría de masas de la distribución a $t = 2$ h después de la administración de la molécula diana (ion $[M+H]^+$ a m/z 313,3), por intensidades.

Ejemplos

Se describirá ahora con más detalle el método de la invención utilizando ejemplos específicos y las figuras descritas en lo que antecede. Estos ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos y de ninguna manera restringen el alcance

de la invención.

EJEMPLO 1

5 En el Ejemplo 1 se estudia, mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas MALDI, la distribución de un fármaco (propranolol) en distintos órganos de un ratón. Por supuesto, se podría utilizar de una manera casi idéntica un dispositivo para obtención de imágenes distinto a la MALDI, como las siguientes fuentes, por ejemplo: SIMS, DESI, DIOS, ICP, MALDI con microscopio, SNOM, SMALDI, LA-ICP, ESI (extracción líquida sobre tejido), MILDI, JEDI, ELDI, etc.

Materiales y métodos

Materiales

- 10
- Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia)
 - Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich)
 - Metanol (Sigma-Aldrich)
 - Propranolol (Sigma-Aldrich)

Animales

- 15 Se utilizaron ratones Swiss machos con un peso de 25-40 g (Charles River, Francia). Se inyectó por vía intravenosa, a una concentración de 7,5 mg/kg, propranolol en solución en NaCl al 0,9%.

Se sacrificaron los animales mediante asfixia con CO₂, transcurridos 20 minutos desde la inyección.

Después, para congelarlos rápidamente, se sumergieron los animales en una solución de isopentano al 100% enfriada con nitrógeno líquido.

- 20 Después se conservaron los animales a -80 °C.

Preparación de muestras para espectrometría de masas

Se cortaron las muestras (tejidos testigo y tejidos que habían recibido fármaco) en capas de 20 µm de grosor utilizando un criostato CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, Francia) enfriado a -26 °C. Se depositaron luego los cortes en portaobjetos de ITO (óxido de indio y estaño) conductores (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

- 25 Por último, se colocaron los cortes en un desecador durante 20 minutos.

Preparación para el registro mediante obtención de imágenes por MALDI

Para el análisis de la molécula diana (propranolol) en los cortes de tejido se utilizó una matriz de DHB. Esta matriz se había preparado a una concentración de 40 mg/ml en metanol/TFA al 0,1% (1:1, v/v). Se depositó la solución de matriz utilizando el sistema de pulverización SunCollect (SunChrome, Alemania).

- 30 En el mismo portaobjetos, pero separado del corte de tejido que había recibido fármaco, se depositó manualmente mediante una pipeta (1 µl por punto), antes de depositar la matriz, un abanico de diluciones de propranolol en agua. Este abanico de diluciones se extiende desde 10 pmol/µl hasta 0,02 pmol/µl e incluye siete puntos.

Preparación para el cálculo del TEC

- 35 Sobre un corte de tejido testigo de otro animal entero, se preparó también una solución 10 mg/ml de matriz de CHCA en ACN/TFA al 0,1% (7:3, v/v), a la que se añadió una solución 10 pmol/µl de propranolol. Se depositó la solución de matriz utilizando el sistema de pulverización SunCollect (SunChrome, Alemania) para cubrir la superficie del corte de tejido.

Registro de imágenes por MALDI

- 40 Se obtuvieron las imágenes utilizando un espectrómetro de masas AutoFlex Speed MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con un láser Smartbeam. Los datos se generaron en modo de reflectrón positivo. Se obtuvieron un total de 700 espectros para cada punto con una frecuencia láserica de 1.000 Hz y una resolución espacial de imagen de 300 x 300 µm², en un intervalo de masas de 100 Da a 1.000 Da. Se utilizó el *software* Fleximaging, versión 2.1, para reconstruir las imágenes.

1-Cálculo del TEC de la molécula diana (propranolol) en una muestra testigo

- 45 Se deposita sobre un portaobjetos un corte sagital del animal entero, preparado como se ha indicado más arriba, y se utiliza como muestra testigo.

Se mezcla con la matriz indicada más arriba la solución de propranolol utilizada como patrón interno, antes de depositar la mezcla resultante sobre la muestra testigo.

Después se analiza la muestra testigo mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas, para obtener una imagen de la distribución del patrón interno en la muestra testigo y en el portaobjetos de soporte (Figura 3B).

- 5 Ventajosamente, se pueden localizar de antemano los diversos órganos de interés mediante obtención óptica de imágenes de la muestra testigo (Figura 3A).

10 A continuación, en la imagen por espectrometría de masas de la muestra testigo se delimitan en el portaobjetos varias regiones de interés (ROI), con las mismas dimensiones para cada órgano. Se seleccionó como señal de referencia la intensidad de los picos del espectro de masas. Se registraron las intensidades medias del patrón interno para cada ROI y cada órgano de interés. Para cada órgano, se calculó una intensidad media (media de ROI) a partir de la intensidad obtenida para toda la ROI correspondiente. Se utilizará esta media de ROI para calcular el coeficiente de extinción del propranolol en cada órgano estudiado.

La Figura 5 muestra un diagrama esquemático de estos distintos pasos para el caso del riñón.

- 15 La Figura 6A resume la media de ROI obtenida para el propranolol en los distintos órganos de interés en la muestra testigo, y la Figura 6B muestra el histograma de las correspondientes intensidades de señal obtenidas.

Se puede calcular entonces el TEC (Figura 7A) utilizando los valores de media de ROI del portaobjetos y de cada órgano, según la fórmula matemática:

$$TEC = \frac{Int(portaobjetos)_x}{Int(tejido)_x}$$

- 20 Así, para la misma concentración de propranolol la señal asociada en el riñón se ha dividido por casi 13 en comparación con la señal esperada, es decir, la señal en el portaobjetos. Por otro lado, la señal se ha dividido solo por 4,82 en el hígado y por 7,96 en el corazón. La señal se ha dividido por menos de 8 en los pulmones y por 6,18 en el cerebro.

2-Curva de calibración para propranolol

- 25 En el ejemplo aquí descrito que utiliza las Figuras 8 y 9, la señal de referencia para la molécula diana (propranolol) corresponde a la señal obtenida para un abanico de patrones con siete concentraciones de propranolol.

Se depositan manualmente sobre un portaobjetos con una pipeta, y se dejan secar, siete gotitas de una solución de propranolol y matriz, que corresponden a siete concentraciones diferentes de propranolol (de 0 a 3 pmol/μl). Para facilitar la lectura de los resultados, se depositan las gotitas en concentraciones crecientes y separadas lo suficiente para evitar cualquier riesgo de solapamiento.

- 30 La imagen por espectrometría de masas obtenida para estas distintas concentraciones (Figura 8B) se normaliza para todos los puntos del abanico utilizando una ROI de dimensiones idénticas, a partir de la cual se define una intensidad de referencia media, o señal de referencia, para el propranolol. Entonces se puede trazar una línea de calibración (Figura 9B), lo que permite después correlacionar durante el análisis cualquier intensidad de señal obtenida para el propranolol con una concentración por píxel.

- 35 3-Cuantificación de propranolol directamente en la imagen mediante espectrometría de masas de la muestra

Se deposita sobre un portaobjetos, para realizar un análisis mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas (Figura 10B), un corte sagital del animal entero, preparado como se ha especificado más arriba y, si es posible, en el mismo plano que el corte utilizado como muestra testigo durante el cálculo del TEC.

- 40 La intensidad de señal obtenida para el propranolol se incrementa en cada órgano de interés en función del TEC calculado para cada uno.

45 Se obtiene una imagen por espectrometría de masas del corte del animal entero, en la cual la intensidad de la señal corresponde a la intensidad absoluta, es decir, la intensidad de la concentración de propranolol solo (Figura 10C). Se puede correlacionar esta imagen con la línea de calibración previamente calculada para el propranolol, a fin de determinar directamente la cantidad de propranolol en la muestra por visualización de la imagen.

Así, en el ejemplo aquí descrito, se observa que el propranolol está prácticamente ausente del hígado y de los pulmones, en contraste con el cerebro, donde la distribución de propranolol es mayor, con una cantidad total de la molécula diana de aproximadamente 5 ng. También se observa propranolol en los riñones y en los pulmones, con cantidades en el intervalo de 1,28 ng a 2 ng.

EJEMPLO 2

En el segundo ejemplo se estudia mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas MALDI la distribución de otro fármaco (olanzapina) en los riñones de un ratón. Podría emplearse de manera prácticamente idéntica cualquier otro dispositivo de obtención de imágenes.

5 Materiales y métodos

Materiales:

- Ácido hidroxicinámico (CHCA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia),
- Ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich)
- Acetonitrilo, DMSO, agua (Sigma-Aldrich)
- 10 - Olanzapina (Lilly Research Laboratories, Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN)

Animales:

Se utilizaron ratones Swiss machos con un peso de 25-40 g (Charles River, Francia). Se administró por vía oral olanzapina a una concentración de 8 mg/kg.

Se sacrificaron los animales mediante asfixia con CO₂, transcurridas 2 horas desde la administración.

- 15 Después, para congelarlos rápidamente, se sumergieron los animales en una solución de isopentano al 100% enfriada con nitrógeno líquido.

Después se conservaron los animales a -80 °C.

Preparación de muestras para espectrometría de masas:

- 20 Se cortaron las muestras en capas de 10 µm de grosor en condiciones idénticas a las del Ejemplo 1 precedente (cortes de riñón testigo y de riñón que había recibido fármaco).

Preparación para el registro mediante obtención de imágenes por MALDI:

Para el análisis de la molécula diana (olanzapina) en los cortes de tejido que habían recibido fármaco se utilizó una matriz de CHCA. Esta matriz se había preparado a una concentración de 10 mg/ml en ACN/TFA al 0,1% (7:3, v/v). Se depositó la solución de matriz utilizando el sistema de pulverización SunCollect.

- 25 En el mismo portaobjetos, pero separado del corte de tejido que había recibido fármaco, se depositó manualmente mediante una pipeta (1 µl por punto), antes de depositar la matriz, un abanico de diluciones de olanzapina en DMSO. Este abanico de diluciones se extiende desde 60 pmol/µl hasta 1 pmol/µl e incluye siete puntos.

Preparación para el cálculo del TEC:

- 30 Sobre un corte de tejido testigo de riñón (de otro animal), se preparó también una solución 10 mg/ml de matriz de CHCA en ACN/TFA al 0,1% (7:3, v/v), para lo cual se preparó una solución 10 pmol/µl de olanzapina adicional. Se depositó la solución de matriz utilizando el sistema de pulverización SunCollect para cubrir la superficie del corte de tejido.

Registro de imágenes por MALDI:

- 35 Se obtuvieron las imágenes de manera idéntica al Ejemplo 1, pero con una resolución espacial de imagen de 200 x 200 µm².

1-Cálculo del TEC de la molécula diana (olanzapina) en una muestra testigo

Se deposita sobre un portaobjetos un corte sagital testigo de riñón, preparado como se ha especificado más arriba, y se utiliza como muestra testigo. Se mezcla con la matriz indicada más arriba la solución de olanzapina utilizada como patrón interno, antes de depositar la mezcla resultante sobre la muestra testigo.

- 40 Después se analiza la muestra testigo mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas, para obtener una imagen de la distribución del patrón interno en la muestra testigo y en el portaobjetos de soporte (Figura 12B). La imagen óptica de la muestra testigo presentada en la Figura 12A permite visualizar el órgano de interés, es decir, el riñón.

- 45 A continuación, en la imagen por espectrometría de masas de la muestra testigo se delimitan varias regiones de interés (ROI), con las mismas dimensiones, en el riñón y en el portaobjetos. Se seleccionó como señal de referencia la intensidad de los picos del espectro de masas. Se calculó la intensidad media (media de ROI) como en el Ejemplo 1. Se utilizará esta media de ROI para calcular el coeficiente de extinción de olanzapina en el riñón.

Se calcula el TEC (Figura 12C) según la misma metodología que en el Ejemplo 1. Se observa así que, para la misma concentración de olanzapina, la señal asociada en el riñón se ha dividido por casi 22,2 en comparación con la señal esperada, es decir, la señal en el portaobjetos.

2-Curva de calibración para olanzapina

- 5 La señal de referencia para olanzapina, representada en la Figura 13, corresponde a la señal obtenida para un abanico de patrones con siete concentraciones de olanzapina.

10 Se depositan manualmente sobre un portaobjetos con una pipeta, y se dejan secar, siete gotitas de una solución de olanzapina y matriz, que corresponden a siete concentraciones diferentes de olanzapina (de 0 a 60 pmol/μl). Para facilitar la lectura de los resultados, se depositan las gotitas en concentraciones crecientes y separadas lo suficiente para evitar cualquier riesgo de solapamiento.

15 La imagen por espectrometría de masas obtenida para estas distintas concentraciones (Figura 13A) se normaliza para todos los puntos del abanico utilizando una ROI de dimensiones idénticas, a partir de la cual se define una intensidad de referencia media, o señal de referencia, para la olanzapina. Entonces se puede trazar una línea de calibración (Figura 13B), lo que permite correlacionar durante el análisis cualquier intensidad de señal obtenida para la olanzapina con una concentración en pmol por mm².

3-Cuantificación de olanzapina utilizando la imagen por espectrometría de masas de la muestra

20 Se deposita sobre un portaobjetos, para realizar un análisis mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas (Figura 14A), un corte sagital de riñón tratado con olanzapina, preparado como se ha especificado más arriba y, si es posible, en el mismo plano que el corte utilizado como muestra testigo durante el cálculo del TEC. Se obtiene así una imagen por espectrometría de masas del corte de riñón, en el cual la olanzapina se localiza, mediante la detección del ion con *m/z* 313,3 (Figura 14B), principalmente en la médula.

La intensidad de señal obtenida para la olanzapina se normaliza en el riñón en función del TEC calculado de antemano. Después se pueden correlacionar estos datos con la línea de calibración previamente calculada para la olanzapina, a fin de obtener su concentración total en el riñón, en pmol/mm².

- 25 Entonces, sabiendo el grosor y el área superficial del corte de riñón analizado, es posible determinar la cantidad de olanzapina en gramos por gramo de tejido en la muestra.

Así, en el ejemplo aquí descrito, se puede calcular una concentración media de olanzapina (en tres experimentos) de 41,1 μg/g de tejido.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico, que comprende los pasos siguientes:

- a) depositar sobre un soporte la muestra de tejido biológico a analizar;
- 5 b) analizar la muestra de tejido biológico mediante espectrometría de masas, para obtener el espectro de masas de la molécula diana en dicha muestra de tejido biológico;
- c) ponderar una señal asociada al espectro de masas de la molécula diana en dicha muestra de tejido biológico mediante un coeficiente de extinción (TEC) específico de la molécula diana y de la muestra de tejido biológico; y
- 10 d) utilizar la señal ponderada de la molécula diana para determinar la cantidad de molécula diana en la muestra de tejido biológico remitiéndose a una curva de calibración para la molécula diana,

en donde el TEC corresponde a:

$$\text{TEC} = \frac{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en un medio de referencia correspondiente a un soporte para muestras solo}}{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en una muestra de tejido testigo}}$$

o

$$\text{TEC} = \frac{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en una muestra de tejido testigo}}{\text{Señal obtenida mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas de la molécula diana en un medio de referencia correspondiente a un soporte para muestras solo}}$$

15 y en donde se calcula el TEC utilizando la misma concentración de la molécula diana en el medio de referencia correspondiente al soporte para muestras solo y en la muestra de tejido testigo.

2. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según la reivindicación 1, en donde se utiliza como molécula patrón una concentración conocida de molécula diana marcada con un isótopo.

20 3. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según la reivindicación 2, en donde se mezcla con una matriz una concentración conocida de molécula diana marcada con un isótopo antes de extender la mezcla resultante tanto sobre la muestra de tejido testigo como sobre el soporte, o en donde se deposita tanto sobre la muestra de tejido testigo como sobre el soporte una concentración conocida de molécula diana marcada con un isótopo.

25 4. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se calcula el TEC solamente una vez para una molécula diana dada en un tipo dado de muestra a analizar y se reutiliza para cada cuantificación de dicha molécula diana en el tipo de muestra dado.

30 5. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula diana es una proteína, un péptido, un lípido, un metabolito, una molécula pequeña o cualquier molécula que pueda ser ionizada mediante espectrometría de masas.

35 6. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula diana es una proteína y se realiza un pretratamiento enzimático y/o químico de dicha molécula diana antes del paso b) de detección, y en donde la detección y cuantificación se llevan a cabo para al menos uno de los péptidos resultantes de dicho pretratamiento.

40 7. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se trata la muestra con al menos un disolvente y/o al menos un detergente antes del paso b) de análisis, a fin de

optimizar la detección de la molécula diana.

- 5 8. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la señal asociada al espectro de masas de la molécula diana corresponde a la intensidad del pico, el área del pico o la relación señal/ruido de dicho espectro de masas.
9. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se pondera directamente en la muestra analizada la intensidad de la señal de la molécula diana, con el fin de visualizar simultáneamente la distribución y la concentración de la molécula diana en dicha muestra.
- 10 10. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde antes del paso b) de análisis se evalúa la homogeneidad del depósito de matriz sobre la muestra con relación a un depósito de una matriz de referencia.
- 15 11. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en dicha muestra biológica se detectan y se cuantifican simultáneamente al menos dos moléculas diana diferentes.
- 20 12. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra biológica es un corte de al menos un tejido y en donde se detecta y se cuantifica la molécula diana mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas directamente en el tejido.
- 25 13. El método para detectar y cuantificar mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas una molécula diana en una muestra de tejido biológico según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra de tejido biológico es un corte de animal entero y en donde se detecta y se cuantifica la molécula diana mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas directamente en dicho corte para comparar simultáneamente la distribución de dicha diana en diversos tejidos del animal.
- 30 14. Un medio para datos legible por ordenador que comprende instrucciones ejecutables por ordenador adecuadas para permitir que un sistema informático ejecute el paso c) del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y que comprende opcionalmente una base de datos de TEC para al menos una molécula diana en al menos dos tipos distintos de muestra y/o una base de datos de la señal de referencia de al menos una matriz utilizada en obtención de imágenes por espectrometría de masas.

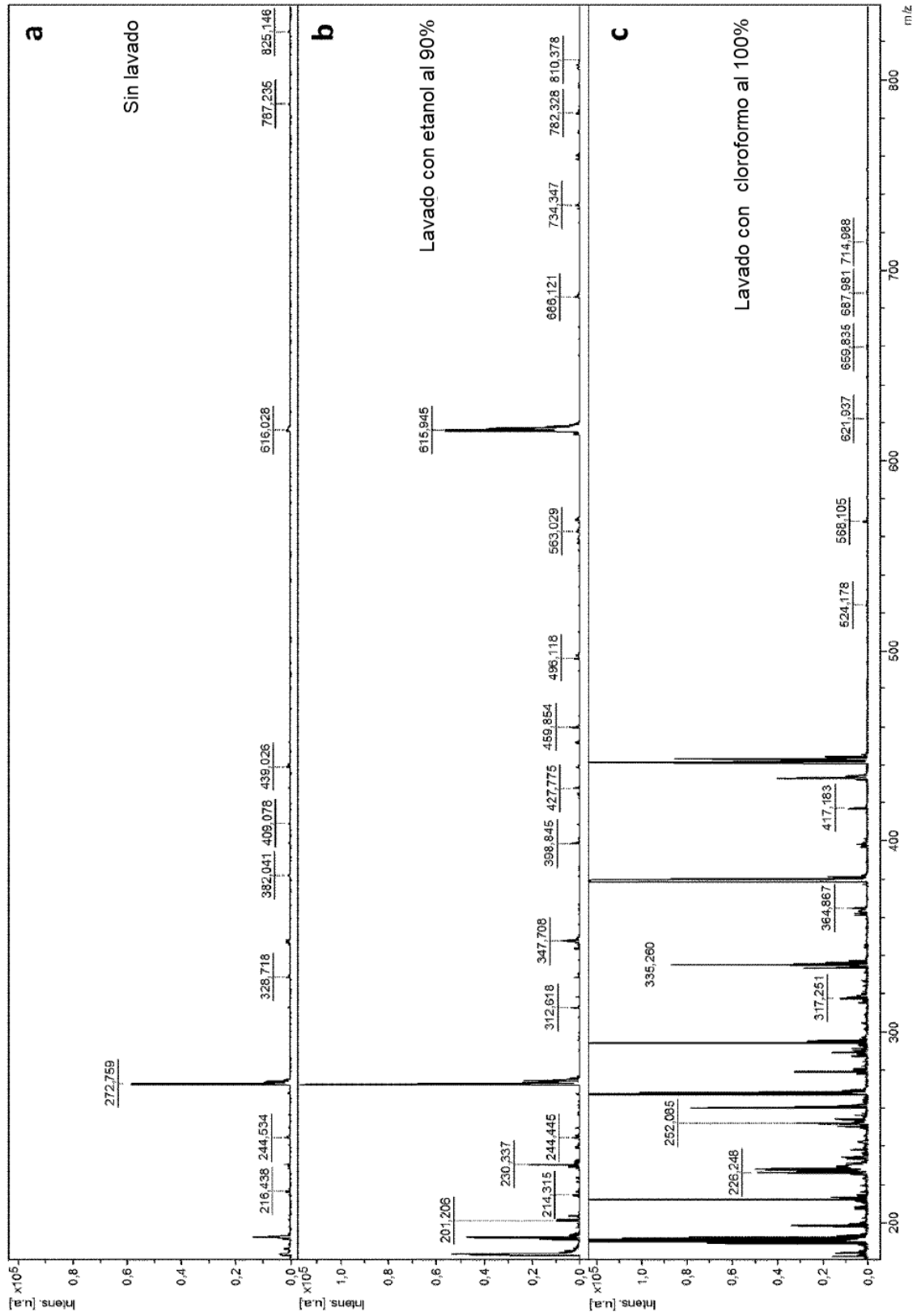


FIGURA 1

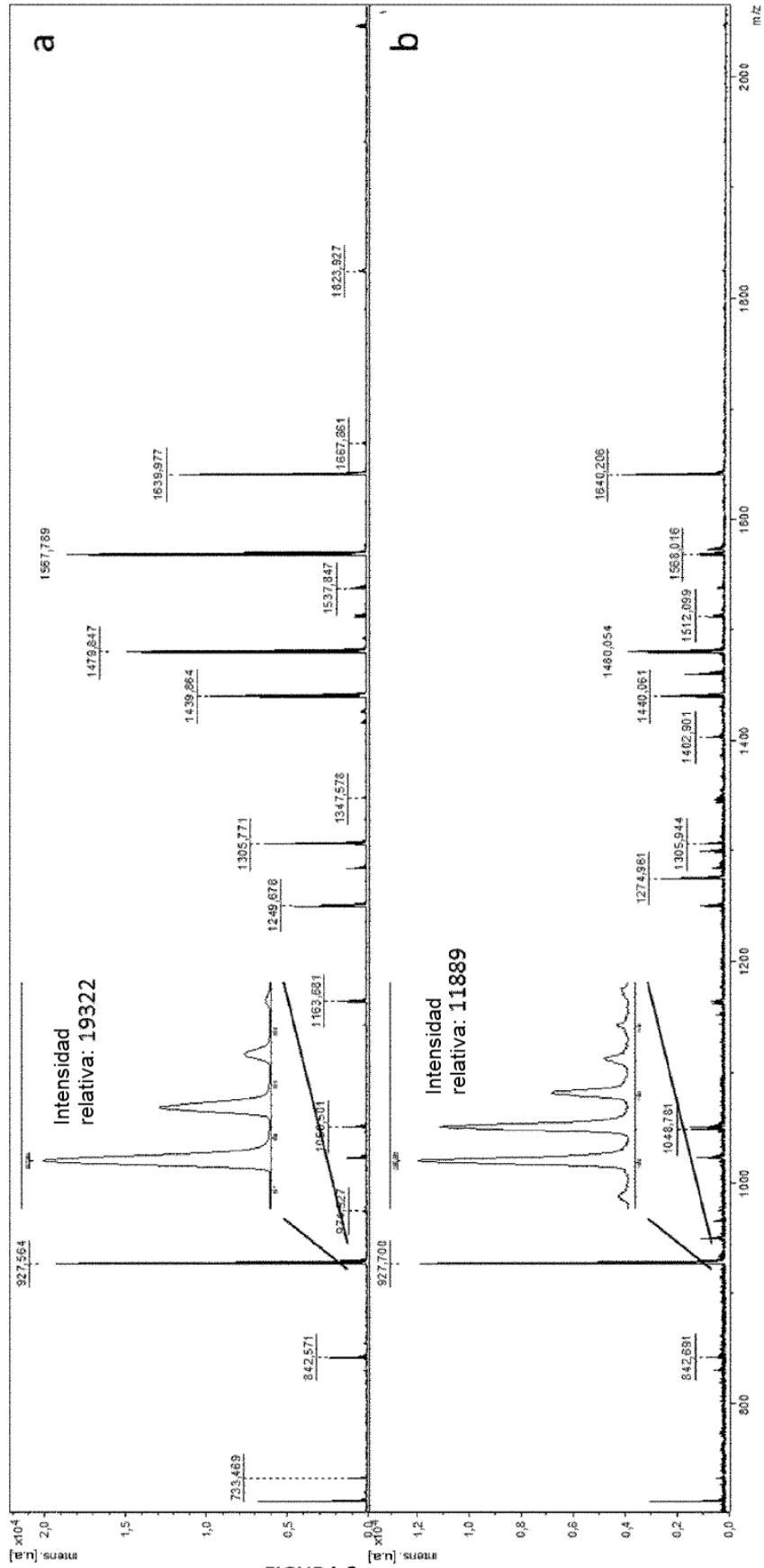


FIGURA 2

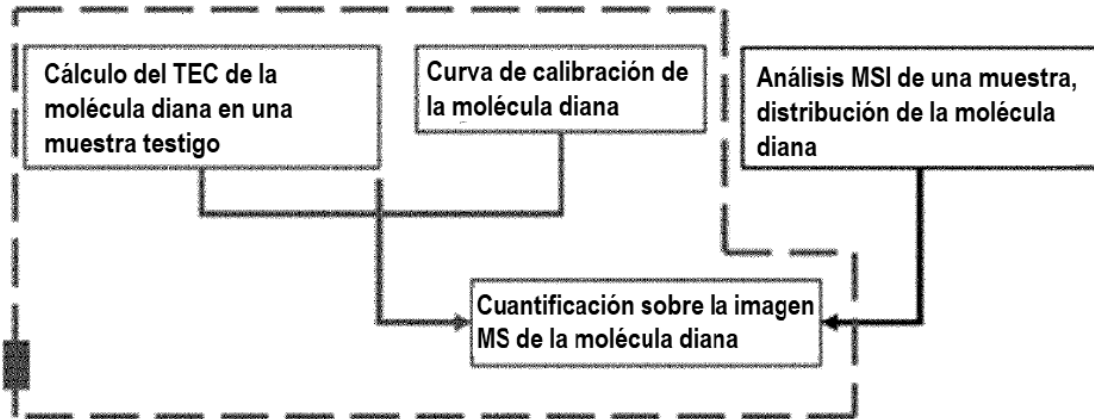


FIGURA 3

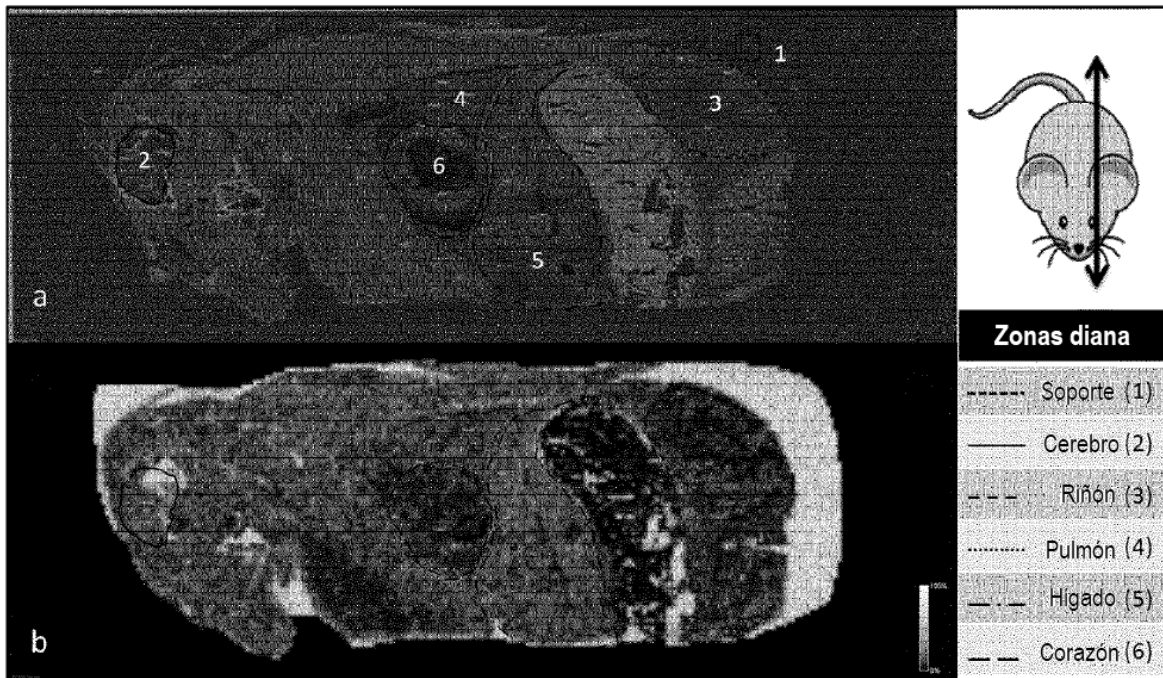


FIGURA 4

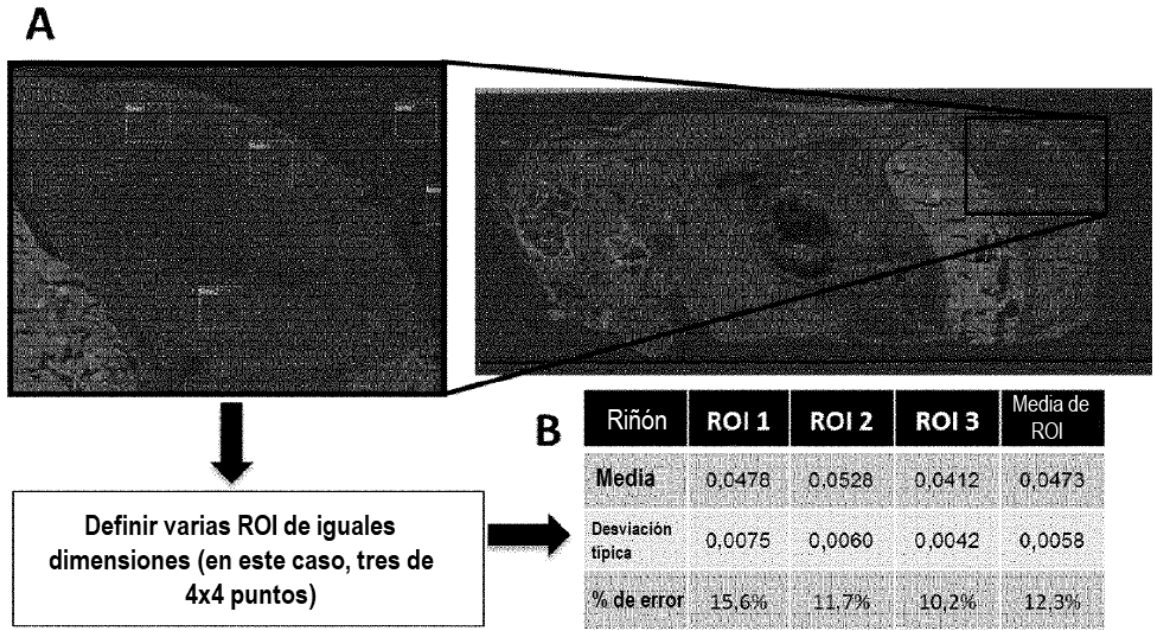


FIGURA 5

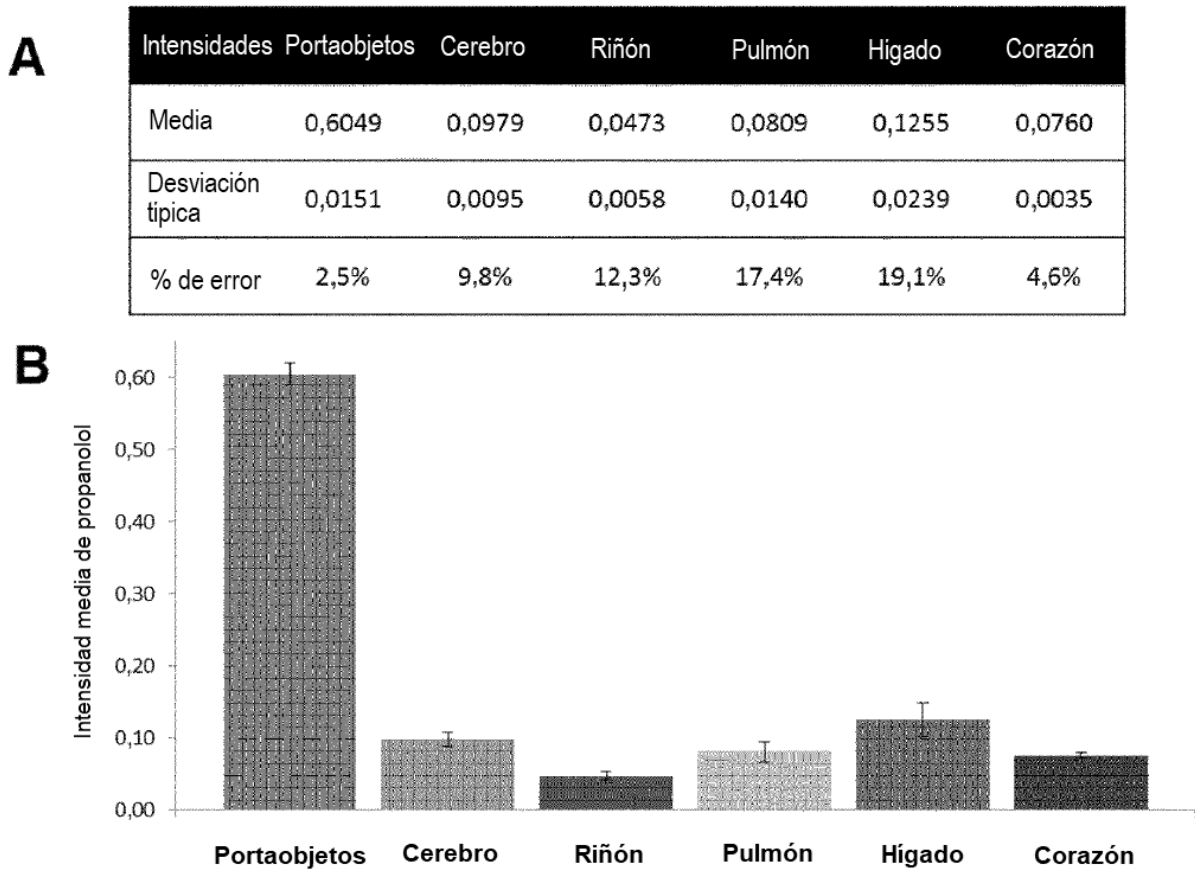


FIGURA 6

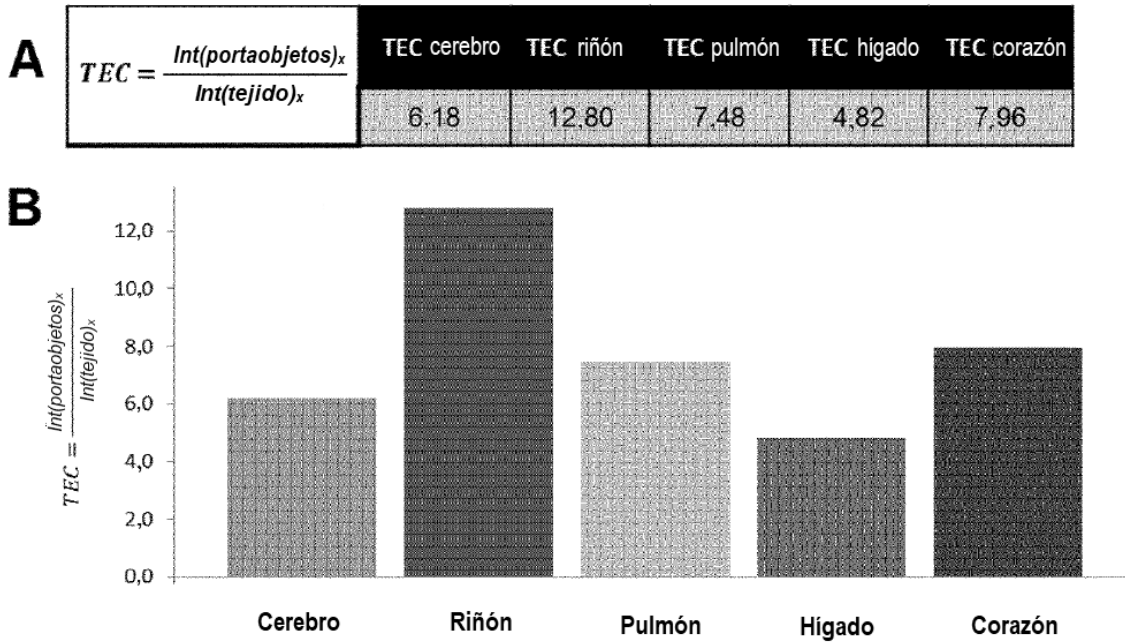


FIGURA 7

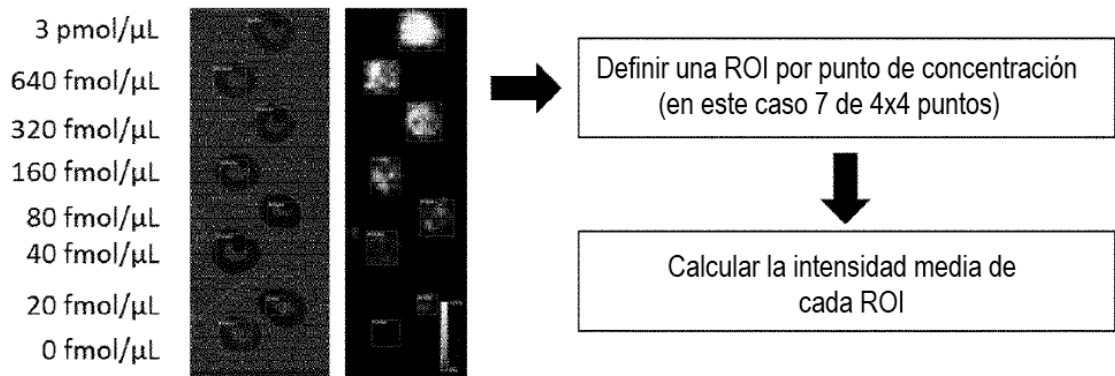


FIGURA 8A

FIGURA 8B

Concentración (fmol/píxel)	0,0	1,5	1,3	2,8	5,7	8,9	19,4	65,2
Media	0,0011	0,0459	0,0567	0,1498	0,2956	0,6847	0,8251	2,0343

FIGURA 8C

Concentración (fmol/píxel)	0,0	1,5	1,3	2,8	5,7	8,9	19,4	65,2
Media	0,0000	0,0074	0,0075	0,0187	0,0481	0,1024	0,1290	0,2785

FIGURA 9A

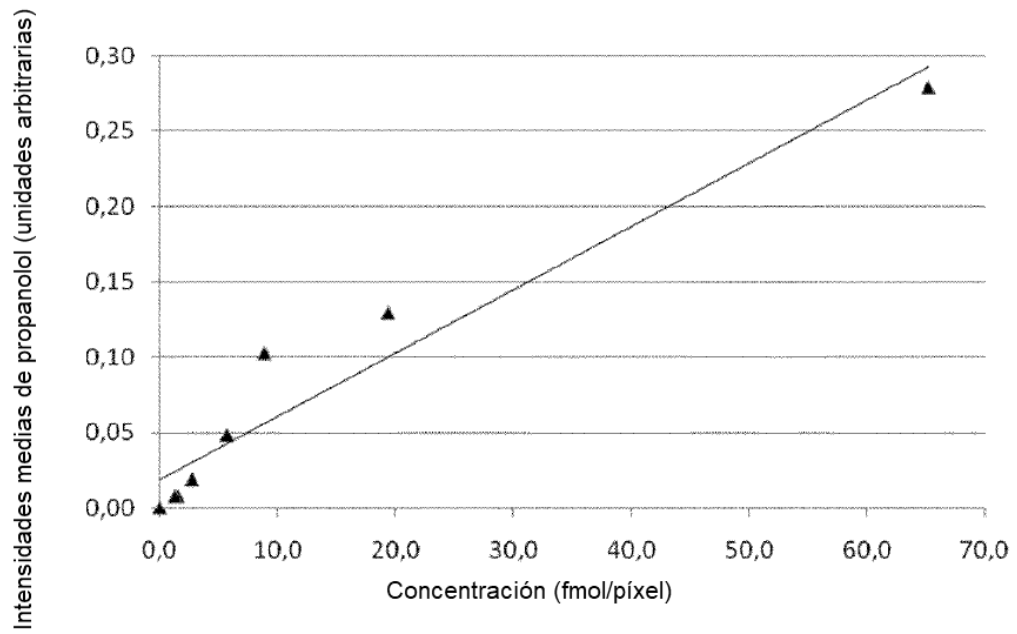


FIGURA 9B

Ecuación de la recta: $y=0,0042x+0,019$

Coefficiente de correlación: $R^2=0,933$

FIGURA 9C

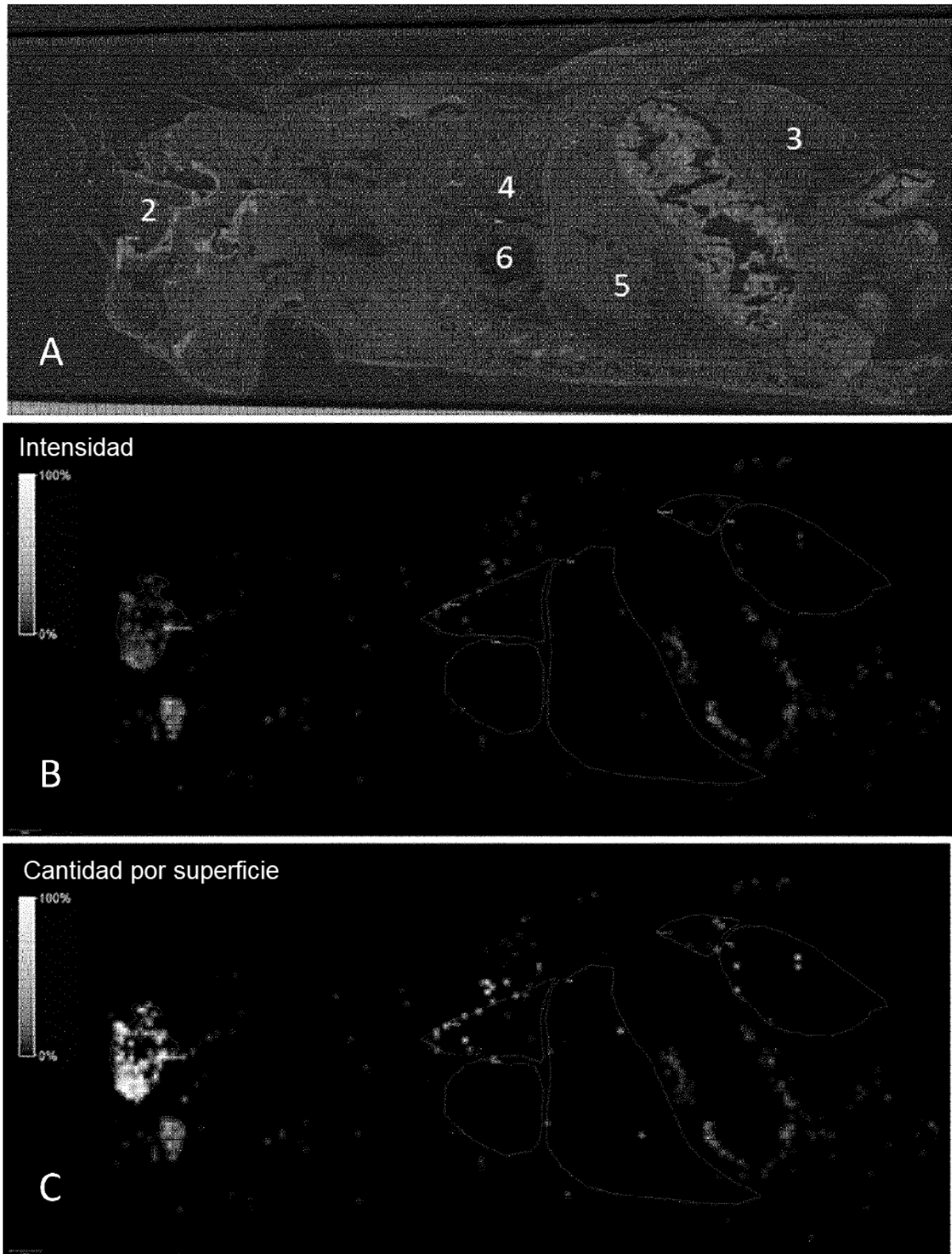


FIGURA 10

$\times \text{TEC}$ $[C]=((\text{Int.})-b)/a$ $\times \text{número de píxeles}$ $\times \text{peso molecular (M)}$

	TEC	Intensidad media por órgano	Intensidad normalizada según TEC	Correlación con curva de calibración (fmol/píxel)	Cantidad de molécula diana en el órgano en todo el área (fmol)	Cantidad de molécula diana en el órgano en todo el área (g)
Cerebro (172 píxeles)	6,18	0,0752	0,465	106,094	19021 (19,02 pmol)	4,93318E-09 (4,93 ng)
Riñón (511 píxeles)	12,8	0,00654	0,0838	15,422	7880 (7,88 pmol)	2,04E-09 (2,04 ng)
Pulmón (253 píxeles)	7,48	0,01346	0,1007	19,454	4922 (4,92 pmol)	1,28E-09 (1,28 ng)
Higado (1.122 píxeles)	4,82	0,00719	0,0347	3,729	4184 (4,18 pmol)	1,09E-09 (1,09 ng)
Corazón (328 píxeles)	7,96	0,00576	0,0458	6,386	2082 (2,08 pmol)	5,40E-10 (0,54 ng)

FIGURA 11

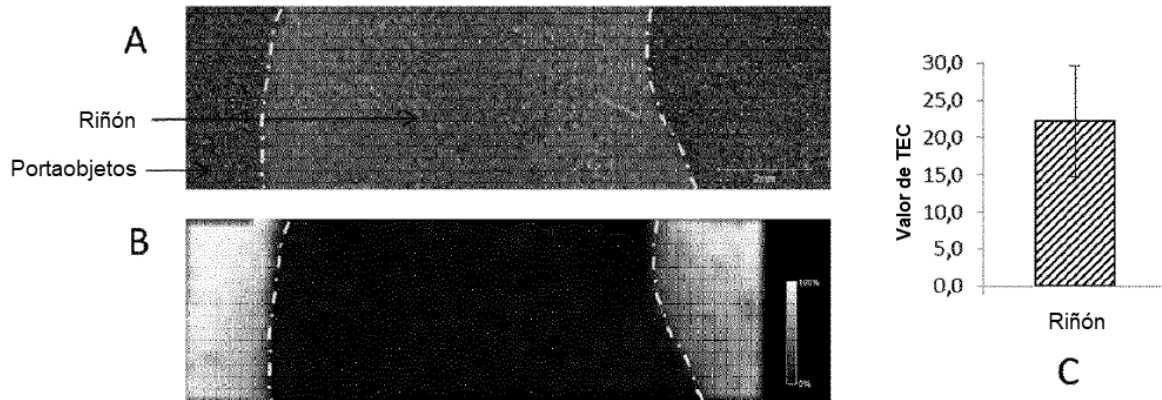
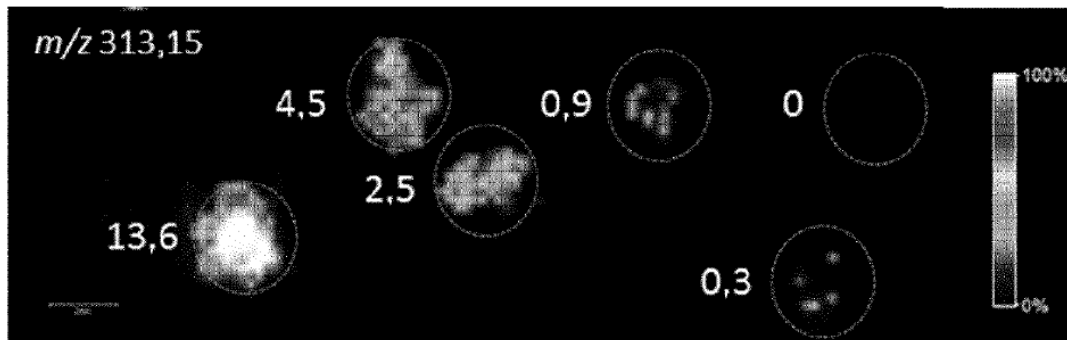
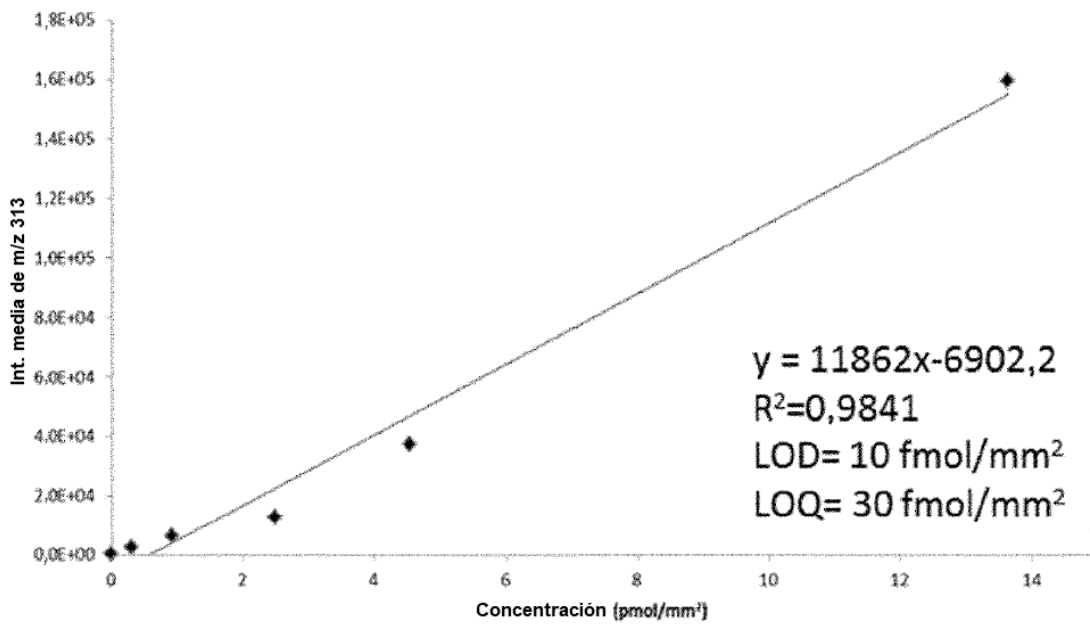


FIGURA 12



A



B

FIGURA 13

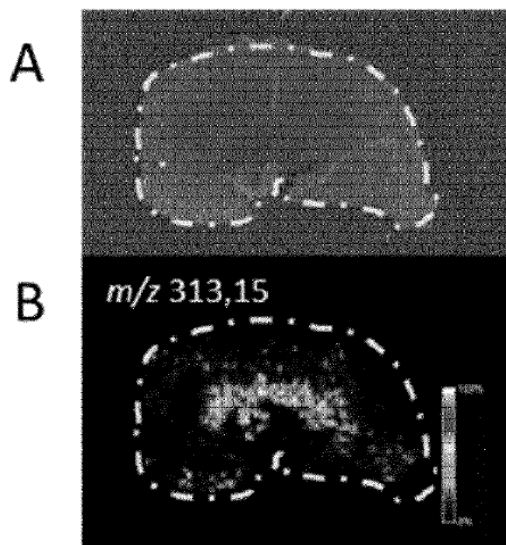


FIGURA 14