(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 781 374**

(51) Int. CI.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
H01J 49/16 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/60 (2006.01)
H01J 49/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2016 PCT/EP2016/078131**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085251**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2016 E 16801740 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3377894**

(54) Título: **Método para el análisis de la unión de fármacos en una muestra de tejido**

(30) Prioridad:

20.11.2015 SE 1551503

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2020

(73) Titular/es:

TREAT4LIFE AB (100.0%)
c/o Roger Appelqvist, Föreningsgatan 83 A
212 14 Malmö , SE

(72) Inventor/es:

MARKO-VARGA, GYORGY;
FEHNIGER, THOMAS y
SUGIHARA, YUTAKA

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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 el análisis de la unión de fármacos en una muestra de tejido

Campo de la invención

Esta invención se refiere en general al campo de la obtención de imágenes por espectrometría de masas. Más particularmente el método se refiere a la capacidad para analizar la especificidad de fármacos y selectividad de fármacos, en particular, la invención describe un método multimodal capaz de determinar la presencia y localización de un fármaco y metabolito(s) en muestras de pacientes mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas.

Antecedentes de la invención

Se sabe que las demandas cada vez mayores en el cuidado de la salud en la actualidad presentan grandes perspectivas y exigencias para que la comunidad investigadora establezca y proponga nuevas soluciones que puedan mejorar los desenlaces clínicos con una eficiencia de costes mejorada.

En respuesta a estos desafíos, la atención médica moderna está buscando formas de tratar a los pacientes que sean más eficientes y beneficiosas para el paciente, así como un mayor ahorro de costes. La introducción de directivas regulatorias es fundamental para la comunidad investigadora con el fin de lograr satisfacer las demandas de, por ejemplo, pacientes con cáncer que esperan fármacos que sean más seguros, con menor mortalidad y con un rápido inicio de eficacia.

Por tanto, existe la necesidad de nuevos métodos de diagnóstico, que permitan a un médico tanto diagnosticar la enfermedad como manifestar la respuesta del paciente a la terapia.

Junto con el Instituto nacional del cáncer (*National Cancer Institute*), los NIH y los médicos y científicos locales, se han realizado grandes progresos para resolver y proporcionar una estrategia de validación y descubrimiento de biomarcadores proteicos. Estas directrices regulatorias proporcionan proteínas, péptidos u otros biomarcadores estandarizados, sensibles, específicos, cuantitativos y fácilmente accesibles de alta calidad de salud, enfermedad y respuesta a la terapia en los procesos de aprobación de las agencias reguladoras (por ejemplo, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos; FDA). Estos desarrollos son vitales para que los profesionales sanitarios mejoren el diagnóstico al comprender los mecanismos del modo de acción de fármacos, detecten cánceres en una etapa temprana, identifiquen la probabilidad de recaída del cáncer y estratifiquen estadios con supervivencias diferenciales.

El cáncer también se conoce como neoplasia maligna o desarrollo tumoral maligno patológico. Los mecanismos de la enfermedad cancerígena implican un crecimiento celular anómalo que dará como resultado la invasión y la mayor diseminación posible de estas células cancerosas a otras partes de los órganos y regiones dentro del cuerpo. Los signos y síntomas más comunes incluyen generalmente sangrado anómalo y/o tos prolongada, pérdida de peso inexplicable y una alteración en los movimientos intestinales, aunque estos síntomas pueden indicar cáncer, también pueden producirse debido a otros problemas y puede haber cientos de diferentes cánceres conocidos que afectan a los seres humanos.

Es un hecho bien conocido que la causa de aproximadamente el 22% de las muertes por cáncer se debe al tabaquismo. Otro 10% se debe al sobrepeso y la obesidad, una dieta pobre y, a menudo, una falta de ejercicio físico y el consumo excesivo de alcohol. Otros factores incluyen ciertas infecciones y/o exposición a infecciones y contaminantes ambientales. En el mundo en desarrollo, cerca del 20% de los cánceres se deben a infecciones tales como hepatitis B, hepatitis C y virus del papiloma humano. Estos factores actúan, al menos en parte, cambiando los genes y las proteínas de una célula. Normalmente, se requieren muchos de tales cambios genéticos antes de que se desarrolle un cáncer. Estadísticamente, aproximadamente el 5-10% de los cánceres se deben a defectos genéticos heredados de los progenitores de una persona.

La propagación del cáncer y las fases de inicio de la enfermedad pueden detectarse mediante ciertos signos y síntomas o pruebas de diagnóstico. Luego, se investiga normalmente además mediante diversos tipos de plataformas de obtención de imágenes médicas, tales como rayos X, CT, PET, MRI u obtención de imágenes por espectrometría de masas y se confirma mediante el diagnóstico patológico de una biopsia. Los beneficios del cribado en el cáncer de mama son valiosos tanto para el paciente como para la sociedad, tal como se demuestra mediante el tratamiento de una mujer y el cáncer de mama, así como para hombres con cáncer de próstata, donde en ambas enfermedades el desarrollo del diagnóstico ha disminuido significativamente las tasas de mortalidad a lo largo de la última década.

El cáncer a menudo se trata con alguna combinación de radioterapia, cirugía y/o quimioterapia. Últimamente, la terapia dirigida ha demostrado ser muy eficiente. La posibilidad de supervivencia depende del tipo de cáncer y la extensión de la enfermedad al comienzo de cualquier tipo de tratamiento terapéutico. Las estadísticas globales

sobre el cáncer son un desafío para el sector sanitario en cualquier país. Se ha descubierto que en 2012 se produjeron aproximadamente 14 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, y estos datos no incluyen a los pacientes con cáncer de piel y otros tipos de melanoma maligno. Provocó aproximadamente 8,2 millones de muertes o el 14,6% de la tasa de mortalidad total en todo el mundo.

Los tipos de cáncer más comunes en hombres son cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal y cáncer de estómago. Los eventos más frecuentes en la mujer son cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de cuello uterino. Sin embargo, si se incluyera la piel y todos los tipos de melanoma maligno, esto representaría aproximadamente el 40% de los casos. Con respecto a los niños, los tipos de cáncer varían y los más comunes son la leucemia linfoblástica aguda y tumores cerebrales. Sin embargo, en África, la enfermedad cancerígena más común es linfoma no Hodgkin. Los costes financieros del cáncer se han estimado en 1,16 billones de dólares estadounidenses al año desde 2010.

La medicina personalizada es un modelo de tratamiento médico, adaptado al paciente individual. Dentro de la medicina personalizada, a menudo se emplean terapias óptimas para seleccionar tratamientos apropiados basándose en el contexto del contenido genético de un paciente u otro análisis molecular o celular.

El uso de información genética, farmacogenómica, ha desempeñado un papel importante en ciertos aspectos de la medicina personalizada, y el término se acuñó por primera vez en el contexto de la genética, aunque desde entonces se ha ampliado para abarcar todo tipo de pruebas de diagnóstico de lectura personal dirigidas.

Algunos de los avances modernos en medicina personalizada se basan en tecnologías “ÓMICAS” (campo de investigación en biología que termina en ómica, tal como genómica, proteómica o metabolómica) que confirman la biología fundamental de un paciente, mediante el mapeo de ADN/ARN y/o proteínas que inicialmente conduce a la confirmación de la enfermedad. El concepto de medicina 4P utiliza estas plataformas ÓMICAS, y actualmente desempeña un papel obligatorio en la atención médica moderna, donde el sistema de atención médica de Obama está invirtiendo recursos significativos para su desarrollo.

Mediante un análisis biomolecular de apoyo, con el fin de confirmar una mutación dada de la enfermedad y si puede vincularse a una determinada enfermedad, los investigadores a menudo realizan un estudio denominado GWAS, un análisis de genoma completo. Un estudio de GWAS analizará una enfermedad y luego secuenciará el genoma de muchos pacientes con esa enfermedad en particular para buscar mutaciones compartidas en el genoma.

Las mutaciones somáticas o puntuales específicas que se determina que están relacionadas con una enfermedad mediante el análisis GWAS pueden usarse entonces para diagnosticar genotipos de enfermedad específicos y posiblemente fenotipos, observando su secuencia genómica para encontrar esa misma mutación.

Múltiples genes influyen colectivamente en la probabilidad de desarrollar muchas enfermedades comunes y complejas. En consecuencia, los avances en la medicina personalizada crearán una diversificación significativa de los enfoques de tratamiento que se ha demostrado que son específicos para el individuo y sus firmas genómicas. La medicina personalizada mejorará la eficacia, al proporcionar mejores desarrollos de diagnóstico, dando como resultado una intervención más temprana y un desarrollo y terapias farmacológicas más eficaces.

Ser capaz de investigar a todos y cada uno de los pacientes de forma individual permitirá un diagnóstico más preciso y un plan de tratamiento personalizado. El genotipado moderno proporciona una descripción detallada de la secuencia de ADN de un individuo; su genoma puede compararse entonces con un genoma de referencia, con el fin de evaluar las variaciones genéticas existentes que pueden explicar el estado patológico concebible.

Además del tratamiento preciso, la medicina personalizada puede ayudar enormemente en los avances de la atención preventiva. Esto se ha demostrado a lo largo de los años, donde las mujeres están genotipándose para ciertas mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, respectivamente, investigando la predisposición debido a antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario.

Por la identidad de una multitud de fuentes de presentación de la enfermedad, que se mapean según las mutaciones que existen dentro de un genoma, indican que cuanto más fácil puedan identificarse en un individuo, mejor oportunidad de tratamientos exitosos.

Disponer del contenido genético de un individuo, en última instancia, permitirá decisiones mejor guiadas para determinar la fuente de la enfermedad y por tanto tratarla o prevenir su progresión.

El diagnóstico complementario es la definición que está usándose para someter a prueba la eficacia y la seguridad de un fármaco específico para un grupo o subgrupo de pacientes objetivo. En muchos casos, el ensayo de diagnóstico complementario es útil para mejorar la eficacia del tratamiento terapéutico.

Hoy en día, en la atención médica moderna, es común que los médicos usen a menudo una estrategia de

ensayo y error hasta que encuentren la terapia de tratamiento más eficaz para su paciente.

Con la medicina personalizada, estos tratamientos pueden adaptarse más específicamente a un individuo y dar una idea de cómo su cuerpo responderá al fármaco y si ese fármaco funcionará basándose en su genoma, y la transcripción posterior con una proteína expresada final.

Últimamente, el campo del cáncer ha descubierto mucho sobre la variedad genética de tipos de cáncer que se presenta dentro de la patología tradicional de la enfermedad. La definición de la heterogeneidad tumoral entre pacientes con cáncer es una diversidad genética dentro de un solo tumor. Entre otras perspectivas, estos descubrimientos plantean la posibilidad de identificar que fármacos con malos desenlaces aplicados a una población general aún pueden tener éxito en una proporción de casos con un perfil genético particular.

En Ho Jeong Kwon *et al*. (Arch. Pharm. Res. (2015) 38: 1718-1727), se demostró que la obtención de imágenes por espectrometría de masas MALDI (MSI) proporciona una plataforma tecnológica que permite la visualización precisa de pequeñas moléculas no marcadas dentro de los espacios bidimensionales de las muestras de tejido. También se proporcionan datos de obtención de imágenes por espectrometría de masas dentro de diversos tipos de cáncer, tales como melanoma maligno, en pacientes a los que se les administra vemurafenib, un inhibidor de la proteína cinasa que selecciona como diana proteínas mutadas BRAF.

El documento US 2012/157328 da a conocer la caracterización de inhibidores de cinasas por inhibición competitiva por desplazamiento.

Por tanto, serían ventajosos métodos de tratamiento mejorados que tengan en cuenta al individuo, con métodos novedosos que podrían ayudar en la orientación del tratamiento en la biología de la enfermedad altamente compleja.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención busca preferiblemente mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias identificadas anteriormente en la técnica proporcionando un método de determinación de la unión específica de un ligando que se une reversiblemente a un sitio de unión en una muestra de tejido usando inhibición competitiva por desplazamiento. El método comprende incubar el ligando en ausencia de un ligando marcado sobre una primera muestra de tejido, incubar el ligando en presencia de un ligando marcado sobre una segunda muestra de tejido, siendo las muestras de tejido primera y segunda secciones adyacentes de la muestra. Se usa espectrometría de masas de obtención de imágenes por MALDI para visualizar posteriormente la localización del ligando unido, usando en la muestra de tejido primera y segunda, respectivamente.

Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, características y ventajas de los cuales es capaz la invención resultarán evidentes y se dilucidarán a partir de la siguiente descripción de realizaciones de la presente invención, haciéndose referencia a los dibujos adjuntos, en los que

la figura 1 es una ilustración de un procedimiento experimental de MSI que muestra (A) una sección de tejido teñida histológicamente (H&E), (B) una sección de tejido impregnada con matriz (matriz de EM), (C) una señal iónica de un fármaco de un experimento de EM y (D) una superposición de la sección histológica y las señales iónicas;

la figura 2 es una ilustración del principio de cuantificación del fármaco del método y la (A) relación lineal entre (B y C) la concentración de fármaco y la respuesta de señal mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas;

la figura 3 muestra (A) imágenes de secciones histológicas con una separación de 10 micrómetros entre la sección de tejido respectiva en todo el tejido tumoral, y (B) obtención de imágenes de tejidos por espectrometría de masas del compuesto farmacológico y su localización específica;

la figura 4 ilustra (A) la estructura molecular del fármaco vemurafenib y (B) la estructura molecular del ^{13}C-vemurafenib marcado con isótopos, en la que el asterisco marca los isótopos de carbono-13;

la figura 5 muestra imágenes de MSI generadas a partir de un tumor de cáncer de melanoma, donde (A) la respuesta de señal de vemurafenib se muestra en modo de EM (m/z 490,078), (B) muestra el ion de fragmento generado a partir el ion original (EM/EM, (m/z 383,1)), (C) muestra el segundo ion de fragmento a partir de la señal de compuesto de vemurafenib (EM/EM, (m/z 262,1)) y (D) muestra la superposición de las tres señales;

la figura 6 muestra una captura de imagen de una sección de tejido de un paciente con cáncer donde se muestra la morfología de disposición de una sola célula;

la figura 7 muestra (B) una captura de imagen de una sección de tejido de un paciente con cáncer donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido con la imagen de histología correspondiente (A), y luego seguido por (C) experimentos donde se administraron ^{13}C-vemurafenib 100 mM (m/z 389,1) y vemurafenib 100 nM (m/z 383,1) dentro del tejido, observando los restos de vemurafenib (m/z 383,1) después de la unión competitiva de ^{13}C-vemurafenib 100 mM, y con la imagen de histología correspondiente (D);

la figura 8 (A) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (EM/EM) (m/z 383,1) de una sección de tejido de un paciente que carece de la mutación V600E en la proteína diana BRAF (control negativo) cuando se administró vemurafenib 100 nM, (B) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (EM/EM) (m/z 383,1) de la sección de tejido cuando se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido de un paciente con una mutación V600E en la proteína diana BRAF y (C) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (EM/EM) (m/z 389,1) de una sección de tejido cuando se administraron vemurafenib 100 nM y ^{13}C-vemurafenib 1 μM dentro del tejido;

la figura 9 (A) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (EM/EM) (m/z 383,1) de una sección de tejido cuando se administró vemurafenib (100 nM) dentro del tejido de un paciente con una mutación de BRAF V600E en la proteína diana BRAF, (B) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (EM/EM) (m/z 383,1) de una sección de tejido cuando se administró vemurafenib dentro del tejido de un paciente que carece de la mutación de BRAF V600E en la proteína diana BRAF (control negativo) y (C) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (EM/EM) (m/z 389,1) de una célula de la sección de tejido cuando se administraron vemurafenib 100 nM y ^{13}C-vemurafenib 1 μM en un paciente con una mutación de BRAF V600E en la proteína diana BRAF; y

las figuras 10 (A) a (D) muestran una captura de imagen para un experimento de titulación por coincubación, donde se administra una concentración fija de vemurafenib a las muestras de tejido y se añade ^{13}C-vemurafenib en una serie de titulación de concentración creciente desde (A) hasta (D) respectivamente, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM y después de la incubación se mide la repuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (EM/EM) (m/z 389,1).

Descripción de realizaciones

La siguiente descripción se centra en realizaciones de la presente invención aplicables a un método de espectrometría de masas para medir la especificidad de fármacos y selectividad de fármacos en una muestra de tejido, y en particular a un ensayo multimodal capaz de examinar la presencia de un único o múltiple(s) fármaco(s) y metabolito(s) en muestras de pacientes mediante obtención de imágenes por espectrometría de masas, y un método para caracterizar las propiedades de interacción de fármacos con la muestra de tejido del paciente. Sin embargo, se apreciará que la invención no está limitada a esta aplicación sino que puede aplicarse a otras aplicaciones de medición de propiedades de moléculas e interacciones en muestras de tejido.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica valiosa porque mide una propiedad intrínseca de cualquier molécula dada, su masa, con una sensibilidad muy alta. Por tanto, la EM puede usarse para medir una amplia gama de tipos de moléculas y una amplia gama de tipos de muestras/materiales biológicos. En este proceso de ionización, el ion precursor se activa por aceleración en una trampa de iones lineal selectiva de masa en condiciones por las cuales algunos de los iones de fragmentos formados son inestables dentro de la trampa. Después de un retraso temporal, los parámetros de estabilidad de la trampa de iones se cambian para permitir la captura de fragmentos que eran inestables anteriormente. El resultado es un espectro de iones del producto que se origina a partir de iones precursores con una distribución de energía interna modificada. Es posible seguir la evolución de la distribución de energía interna precursora durante muchos milisegundos después de la admisión de los iones precursores en la trampa de iones lineal. Los espectros de iones de productos de fragmentación retardados temporalmente muestran normalmente productos de fragmentación secuencial reducidos que conducen a espectros que se interpretan más fácilmente. Se han identificado varios parámetros experimentales importantes para la fragmentación retardada temporalmente y la técnica tiene aplicaciones tanto para pequeños iones precursores como para moléculas con carga múltiple.

La espectrometría de masas en tándem (EM/EM) está en el centro de la mayoría de las investigaciones modernas por espectrometría de masas de mezclas complejas. La fragmentación implica la activación de un ion precursor por medio de colisiones con un gas objetivo y puede producir fragmentos cargados y neutros. La naturaleza de los iones de fragmentos, así como sus intensidades, a menudo es indicativa de la estructura del ion precursor y, por tanto, puede proporcionar información útil para la identificación de analitos desconocidos, así como proporcionar una técnica de examen útil para diferentes clases de analitos. La activación por medio de colisiones múltiples tanto prolonga el tiempo de activación como permite que se depositen energías más altas en iones precursores. Mayores presiones del gas de colisión también implican mayores tasas de relajación de colisión.

La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas. MALDI tradicional es un proceso de tres etapas, donde la muestra se mezcla con un

material de matriz adecuado y se aplica a una placa de metal de muestra. Un láser pulsado irradia la muestra, y las moléculas de analito se ionizan protonándose o desprotonándose en el penacho caliente de gases expulsados, y luego pueden acelerarse en el espectrómetro de masas para su análisis.

La obtención de imágenes por espectrometría de masas MALDI se define como el uso de desorción láser asistida por matriz con una tecnología de obtención de imágenes por espectrometría de masas (MALDI-MSI), donde la muestra consiste en una sección de tejido delgado. La preparación de las muestras de sección de tejido es una etapa vital dentro de MSI. Se añade la matriz de MALDI a los cortes de tejido finos montados en portaobjetos de microscopio conductores. La sustancia de la matriz debe absorber a la longitud de onda del láser e ionizar el analito. La selección de matrices y el sistema de disolventes depende en gran medida de la clase de analito del que se desea obtener imágenes. El analito debe ser soluble en el disolvente con el fin de mezclar y recristalizar la matriz. La matriz debe tener un recubrimiento homogéneo con el fin de aumentar la sensibilidad, intensidad y reproducibilidad de disparo a disparo. Se utiliza disolvente mínimo cuando se aplica la matriz con el fin de evitar la deslocalización.

Después de esta etapa, el portaobjetos del microscopio se inserta en un espectrómetro de masas MALDI. El instrumento registrará la distribución espacial de especies moleculares, tales como compuestos farmacológicos y moléculas de fármacos de metabolitos. Después de eso, puede utilizarse un software de procesamiento de imágenes adecuado para importar datos del espectrómetro de masas para permitir la visualización y comparación con la imagen óptica de la muestra.

Las secciones de tejido también pueden someterse a tinción histológica tras completarse la investigación por MSI. Esto se realiza con el fin de seleccionar como diana zonas de interés y se trata previamente con lavado con el fin de eliminar especies que suprimen moléculas de interés.

La figura 1 ilustra un procedimiento experimental de MSI. El tejido se caracteriza por tinción histológica. Los experimentos de MSI se realizan mediante deposición de matriz, seguidos por experimentos de MSI, realizados mediante análisis de fármacos. La imagen de la sección histológica y las señales iónicas pueden reproducirse y presentarse en la captura de imagen más a la derecha superponiendo las dos imágenes e identificando colocalizaciones comunes. La superposición proporciona evidencias de la localización de células tumorales dentro del tejido y la colocalización del fármaco. Las imágenes se construyen representando gráficamente la intensidad de iones frente a la posición relativa de los datos de la muestra, donde la resolución espacial tiene un gran impacto sobre la información molecular obtenida del análisis.

La aplicación de esta técnica a estudios biológicos ha aumentado significativamente desde su introducción. MALDI-MSI está proporcionando importantes contribuciones para la comprensión de enfermedades, mejorando los diagnósticos y la administración de fármacos. MALDI-MSI ha sido capaz de diferenciar entre fármacos y metabolitos y proporcionar información histológica en la investigación del cáncer, lo que lo convierte en una herramienta prometedora para encontrar nuevos biomarcadores proteicos. La tecnología de obtención de imágenes por espectrometría de masas (MSI) se utiliza actualmente en el descubrimiento de fármacos, así como en el proceso de desarrollo de fármacos dentro de la industria farmacéutica.

Con respecto a la caracterización de fármacos, se ha utilizado la tecnología de MSI en la industria para investigar la distribución de fármacos en los órganos principales. Las propiedades farmacocinéticas de ADME, junto con la posible toxicidad de los fármacos y el metabolismo de los fármacos, son consideraciones regulatorias clave que las agencias de la FDA y EMEA exigen con el fin de aprobar nuevas entidades farmacológicas, donde se usan comúnmente modelos animales. Hoy en día, la plataforma de MALDI es la tecnología de espectrometría de masas más común aplicada en la industria farmacéutica y biotecnológica, así como en las academias y centros de investigación nacionales.

Las microheterogeneidades dentro del tejido pueden compensarse mediante el uso de un patrón interno de matriz que se usa entonces para la normalización de datos y cuantificación. La cobertura total de tejido de la matriz (con o sin) el patrón interno mediante una capa delgada uniforme de cristales de matriz en la superficie del tejido es de importancia imperativa con el fin de proporcionar datos reproducibles y de alta calidad.

La cuantificación de fármacos puede hacerse mediante MALDI/MSI y se han desarrollado a lo largo de los años y se ilustra un ejemplo en la figura 2 (C). La cuantificación de fármacos puede lograrse aplicando una concentración conocida de preparaciones de disolución de fármaco y aplicando esto sobre la superficie del tejido (B). Los niveles variables de las disoluciones de fármaco se analizan a continuación mediante experimentos de obtención de imágenes por MALDI. Las intensidades de respuesta de señal resultantes pueden representarse gráficamente frente a las concentraciones de fármaco y puede establecerse una relación lineal dentro de un experimento de calibración (A), tal como se muestra en la figura 2.

MALDI/MSI no tiene marcador y puede aplicarse a estructuras de fármacos nativas y sus metabolitos dentro de cualquier entorno de tejido. A medida que se produce la difusión del fármaco a través del órgano, se producirá un gradiente de concentración a través de las diversas capas de células. Esta disposición de fármaco y

metabolito(s) localizados entre las células o dentro de las células por todo el tejido dependerá del microentorno del tejido, así como de las variables farmacocinéticas para una estructura de fármaco dada. En la figura 3A-B se muestra una distribución espacial identificada del fármaco en gradientes de concentración por toda la estructura y morfología tisulares que hace posible alinear los niveles del fármaco y correlacionarlos con la morfología tisular. En la figura 3, imágenes histológicas del tejido (figura 3A), clasificadas en el presente documento en secciones adyacentes, describen la estructura y morfología del tumor. El entorno del tumor se utiliza como arquitectura para los datos de imágenes de fármacos (experimentos de MSI, ilustrados en la figura 3B), analizando vemurafenib (MS m/z 490,078). Tal como puede observarse, diferentes elementos de la estructura del tejido se colocalizan con la señal de vemurafenib.

A lo largo de la última década se han desarrollado muchos métodos cuantitativos diferentes basados en EM, que se basan en un pequeño número de técnicas fundamentales, que implican habitualmente alguna clase de patrón frente al que compararse.

Los métodos de obtención de imágenes de fármacos cuantitativos relativos miden la razón de abundancia relativa entre dos o más muestras y pueden dividirse en métodos basados en marcador y sin marcador. Diferentes técnicas ofrecen diferentes ventajas; por ejemplo, el marcaje *in vivo* es más eficaz, marcando posiblemente cada molécula de una célula, aunque a menudo es poco práctico para algunas muestras (por ejemplo, tejido humano) mientras que pueden aplicarse métodos *in vitro* para cualquier tipo de muestra en principio. En todos los casos, existen retos comunes para calcular valores cuantitativos al nivel de molécula de fármaco.

Los métodos cuantitativos de obtención de imágenes basados en EM pueden clasificarse en dos grupos en o bien cuantificación absoluta y/o o bien cuantificación relativa.

La molécula de fármaco sin marcador puede cuantificarse mediante métodos de análisis relativos que relacionan una respuesta de señal a otra con las señales de lectura de señal respectiva. Se determinan las intensidades pico y se calculan las razones para la coincidencia molecular en diferentes experimentos.

La cuantificación absoluta ha resultado ser un reto, y las estrategias implican a menudo el uso de una versión marcada de la molécula de fármaco. Los compuestos de fármaco pueden distinguirse habitualmente incorporando isótopos estables dentro de la estructura, alterando de ese modo la masa de todas las demás moléculas en cualquier muestra dada de un modo predecible (tal como se muestra en la figura 4). Estos isótopos estables pueden incorporarse metabólicamente en (idealmente) todas las moléculas de compuesto de fármaco, *in vivo*, o puede usarse un reactivo químico para marcar *in vitro*. El fármaco marcado con isótopos tiene exactamente las mismas propiedades fisicoquímicas que el fármaco no marcado.

Actualmente hay pocas opciones terapéuticas para pacientes con enfermedades cancerígenas, y se necesitan urgentemente nuevas perspectivas de la patogenia de esta enfermedad letal. Estudios con pacientes en estudios de viabilidad en combinación con modelos de enfermedad en roedores han sido la estrategia que han adoptado los equipos de investigación durante varios años. Además, la correlación entre un modelo de roedor dado con fármaco administrado por un lado y la capacidad de utilizar administraciones controladas a secciones de tejido de órganos aislados con el entorno tumoral intacto es una herramienta valiosa para caracterizaciones de fármacos en un modelo de enfermedad.

En el estudio que subyace a la presente invención, se usa vemurafenib, un inhibidor de la enzima BRAF para el tratamiento de melanoma en estadio tardío, para estudiar la interacción fármaco-tumor. Se ha mostrado que vemurafenib provoca muerte celular programada en líneas celulares de melanoma interrumpiendo la etapa de B-Raf/MEK en la ruta de B-Raf/MEK/ERK. La figura 4A muestra la estructura molecular del fármaco vemurafenib (en la que el asterisco representa los isótopos de ^{13}C. Excepto por la incorporación de isótopos de carbono-13 en el ^{13}C-vemurafenib marcado, las estructuras son idénticas. Es de interés que vemurafenib solo es eficaz si BRAF tiene la mutación V600E común o la mutación de V600K de BRAF de tipo más raro. Aproximadamente el 60% de los melanomas tienen estas mutaciones, pero células de melanoma sin estas mutaciones no se inhiben por vemurafenib.

La figura 5 muestra imágenes de MSI generadas a partir de un tumor de cáncer de melanoma donde se muestra la respuesta de señal de vemurafenib en modo de EM, la imagen superior derecha muestra el ion de fragmento generado a partir del ion original (EM/EM), la imagen inferior izquierda muestra el segundo ion de fragmento a partir de la señal de compuesto de vemurafenib (EM/EM) y la imagen inferior derecha muestra la superposición de las tres señales. Las aplicaciones que se realizan a una resolución de una sola célula son preferibles ya que la localización del fármaco y metabolito(s) puede hacerse con mayor precisión y exactitud. La figura 6 muestra una imagen de histología donde se muestra la disposición de una sola célula en una sección de tejido. Se usa espectrometría de masas de desorción láser (MALDI) para identificar la localización del fármaco (vemurafenib) localización en el tejido canceroso de un paciente. El diámetro del láser captura imágenes a una potencia de resolución de 30 micrómetros en resolución espacial dentro de los compartimentos tisulares.

Una limitación de la localización de fármacos por MALDI-MSI tradicional es que el fármaco y los metabolitos del fármaco pueden unirse o adherirse de manera no específica a partes no relevantes de una muestra de tejido. Esto se hace especialmente evidente para fármacos no optimizados con menor solubilidad o que requieren mayores dosis. Para minimizar esto, las muestras se lavan tras la incubación con el fármaco, en este caso con PBS 3 veces y luego seguido por lavado con agua MilliQ 3 veces consecutivas. Sin embargo, aunque tal lavado reducirá en algún grado las señales de EM resultantes de la unión inespecífica, supone todavía un problema, especialmente dado que las autoridades, tales como FDA y EMEA, requieren información detallada referente a la distribución del fármaco en los órganos principales para aprobar nuevas entidades farmacológicas (NCE).

En el método de la invención, el ligando, tal como un fármaco de molécula pequeña, unido en la muestra de tejido, se desplaza por un ligando marcado con una mayor concentración mediante inhibición competitiva. En la práctica, una muestra de tejido de un paciente se incuba con ligando no marcado, sin y con un ligando marcado con isótopos sobre secciones adyacentes de muestras de tejido y luego se visualizan las ubicaciones y se cuantifica el ligando unido y/o ligando marcado usando espectrometría de masas de obtención de imágenes por MALDI. Mientras que la unión inespecífica no es competitiva, la unión específica sí lo es. El uso de un ligando marcado con isótopos permite por tanto distinguir entre unión específica e inespecífica.

En una realización, un método de determinación de la unión específica de un ligando que se une reversiblemente a un sitio de unión en una muestra de tejido usa inhibición competitiva por desplazamiento. El método comprende incubar el ligando (no marcado) en ausencia de un ligando marcado sobre una primera muestra de tejido, incubar el ligando (no marcado) en presencia de un ligando marcado sobre una segunda muestra de tejido, siendo las muestras de tejido primera y segunda secciones adyacentes de una muestra. Posteriormente, la localización del ligando se visualiza usando espectrometría de masas de obtención de imágenes por MALDI en la muestra de tejido primera y segunda, respectivamente.

En una realización, el ligando y ligando marcado son homólogos, uniéndose de manera específica al mismo sitio de unión. En una realización, el ligando marcado está marcado con un isótopo, tal como un ligando marcado con deuterio o un ligando marcado con isótopo de ^{13}C. En una realización, el ligando es vemurafenib y el ligando marcado es ^{13}C-vemurafenib. En una realización, el ligando y/o ligando marcado se cuantifican usando espectrometría de masas de obtención de imágenes por MALDI.

En detalle, se realizaron las etapas experimentales consecutivamente;

(1) se realizó la preparación de secciones de 10 micrómetros de los tejidos de melanoma maligno humano congelados a -20ºC. Después de eso, (2) se realizó la preparación de muestras descongelando lentamente y secando las secciones tumorales a temperatura ambiente. Entonces, se sumergieron las secciones en metanol durante 5 min y se secaron a temperatura ambiente. De manera correspondiente, se manipuló del mismo modo tejido sano humano congelado extirpado de ganglios linfoides, y se usó como controles negativos. (3) Se realizó la incubación con el fármaco durante una hora usando ligando no marcado, en este caso vemurafenib, a una concentración de 100 nM (nanomolar) para determinar la unión de la molécula de ligando a su diana proteica. También se realizaron experimentos de coincubación con secciones tumorales del paciente con un ligando, en este caso vemurafenib, concentración de 100 nM y un exceso de ligando marcado con isótopos estables, en este caso ^{13}C-vemurafenib. Durante los experimentos de titulación, la concentración de vemurafenib marcado con isótopos estables era de 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM (micromolar), respectivamente. (4) Tras la incubación, se lavaron las secciones mediante PBS 3 veces y luego seguido por lavado con agua MilliQ 3 veces consecutivas, y (5) se obtuvieron los espectros de masas usando un instrumento MALDI LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, Alemania), y se obtuvieron las señales del compuesto mediante el instrumento Orbitrap y la trampa de iones. Se realizó el análisis de imágenes usando ImageQuest (Thermo Scientific, Alemania). Para el análisis histológico, se realizaron tanto tinción con H&E como análisis inmunohistoquímico usando anticuerpo monoclonal contra BRAF V600E.

En una realización, se realizan cortes de tejido congelado y se preparan una muestra de tejido primera y segunda a partir de secciones adyacentes del tejido congelado. En una realización, dichas secciones se descongelan, se secan y se sumergen en metanol durante 5 min. En una realización, se realiza la incubación con el ligando (es decir, el fármaco) durante una hora usando ligando no marcado, y se realiza la coincubación durante una hora usando ligando no marcado y un exceso de ligando marcado. En una realización, se lavan las secciones, preferiblemente con PBS 3 veces y luego seguido por lavado con agua MilliQ 3 veces consecutivas. En una realización, se obtienen espectros de masas usando un instrumento MALDI LTQ-Orbitrap, se obtienen señales mediante el instrumento Orbitrap y la trampa de iones y se realiza el análisis de imágenes usando ImageQuest. En una realización, se obtiene el análisis histológico mediante tinción con H&E y/o análisis inmunohistoquímico usando anticuerpo monoclonal.

En una realización, la unión del ligando a la ubicación de la diana proteica se confirma mediante colocalización, tal como mediante análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo monoclonal específico para la diana proteica.

El impacto de esto se muestra en la figura 7, una captura de imagen de una sección de tejido de un paciente con cáncer, donde (A) muestra la imagen de histología de la muestra de tejido y (B) muestra una imagen de MSI de la misma muestra de tejido tras administrarse vemurafenib 100 nM dentro del tejido, donde la respuesta de señal de vemurafenib se muestra en modo de EM. A esto le sigue una sección de tejido del paciente con cáncer, donde (D) muestra la imagen de histología de la muestra de tejido y (C) muestra la imagen de MSI de la muestra de tejido donde se administraron ^{13}C-vemurafenib 100 mM y vemurafenib 100 nM dentro del tejido, donde la respuesta de señal de vemurafenib se muestra en modo de EM. Dependiendo del formato de ensayo elegido, pueden añadirse el vemurafenib y ^{13}C-vemurafenib simultáneamente, proporcionando de ese modo una lectura del método que es cinéticamente competitiva tras la unión a la proteína diana, o por separado. Tal como se muestra claramente, la señal de vemurafenib en la figura 7 (A) se extingue tras la inhibición competitiva del ^{13}C-vemurafenib. Debido a la concentración mil veces superior de ^{13}C-vemurafenib, el vemurafenib unido se desplazará prácticamente por competición por el ^{13}C-vemurafenib. Para vemurafenib no unido que se adhiere de manera inespecífica a partes de la muestra de tejido, no se desplazará de manera específica por competición por el ^{13}C-vemurafenib. Por tanto, puede determinarse vemurafenib unido específicamente usando inhibición competitiva por desplazamiento. Preferiblemente, el ligando marcado se formula a una concentración mayor que el ligando no marcado durante el desplazamiento, tal como concentraciones de cinco a diez mil veces superiores del ligando marcado en comparación con el ligando no marcado. Normalmente, la concentración preferida del fármaco no marcado está en el intervalo nanomolar y la concentración del fármaco marcado con isótopos está en el intervalo micromolar.

En una realización, la concentración de ligando marcado es mayor, tal como de 5 a 10000 veces mayor, o tal como de 10 a 1000 veces mayor, que la concentración del ligando no marcado durante la inhibición competitiva por desplazamiento. En una realización, el ligando no marcado es de concentración nanomolar y el ligando marcado con isótopos es de concentración micromolar.

En las figuras 8 y 9, la adición del compuesto marcado con isótopos (i-vemurafenib) muestra un intercambio competitivo de vemurafenib a i-vemurafenib, una sustitución que proporciona pruebas de unión del fármaco específica y selectiva.

En la figura 8, se muestran secciones de tejido de (A) un control negativo de un paciente que carece de la mutación de BRAF V600E en la proteína diana BRAF y, (B) y (C), secciones de tejido de un paciente con una mutación V600E en BRAF. En de (A) a (C), se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido y se capturó una imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (EM/EM) (m/z 383,1). En (C), se coadministró ^{13}C-vemurafenib 1 μM dentro del tejido y se capturó una imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (EM/EM) (m/z 389,1), que desplaza por competición al vemurafenib 100 nM.

En la figura 9 (A) y (C), se muestran secciones de tejido de un paciente con una mutación V600E en BRAF, y en (B) un control negativo de un paciente que carece de la mutación de BRAF V600E en la proteína diana BRAF. En de (A) a (C), se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido y se capturó una imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (EM/EM) (m/z 383,1). En (C), se coadministró ^{13}C-vemurafenib 1 μM dentro del tejido y se capturó una imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (EM/EM) (m/z 389,1), que desplaza por competición al vemurafenib 100 nM.

Los tejidos de control confirman que vemurafenib no se une en gran medida en tejido que carece de la mutación de BRAF V600E. En su lugar, las muestras de tejido de pacientes con una mutación V600E en BRAF muestran una unión clara a células localizadas dentro del tejido. Además, la especificidad de corte clara de la unión competitiva demuestra la especificidad de la unión del fármaco a las células cancerosas y la diana proteica.

Con el método actual, los datos generados proporcionan propiedades de unión específica, que pueden determinarse tras la administración del fármaco vemurafenib y/o i-vemurafenib. En las figuras 10 (A) a (D), se muestra un experimento de titulación por coincubación. Las adiciones del compuesto marcado con isótopos (^{13}C-vemurafenib) muestran un intercambio competitivo de vemurafenib a i-vemurafenib, una sustitución que proporciona pruebas de unión del fármaco específica y selectiva.

En una realización, el método comprende incubar ligando no marcado con al menos dos concentraciones diferentes de ligando marcado sobre secciones adyacentes de muestras de tejido. En una realización, el método comprende usar una titulación concentraciones diferentes de ligando marcado.

La señal del isótopo de i-vemurafenib (en este caso, ^{13}C-vemurafenib) de la figura 10 se resume en la tabla 1 a continuación. Muestra claramente que la unión competitiva de i-vemurafenib aumenta con niveles crecientes de administración. Los resultados de la espectrometría de masas indican claramente la relación lineal entre la concentración del fármaco de i-vemurafenib y la unión a las células cancerosas, con un fondo de vemurafenib. Además, la cinética del fármaco así como la cinética de los metabolitos tras el tratamiento pueden determinarse usando la metodología descrita. Representando gráficamente los resultados de la titulación en una curva de dosis-respuesta, puede deducirse el valor de CI50, la concentración requerida para una inhibición del 50% del vemurafenib por el ^{13}C-vemurafenib. De manera similar, otras constantes tales como la constante de disociación

del ligando (K_d) pueden deducirse a partir del valor de CI50, por ejemplo, usando la relación de Cheng y Prussoff. Para un inhibidor (tal como vemurafenib, que actúa como inhibidor en la etapa de B-Raf/MEK en la ruta de MAPK/ERK), puede deducirse la constante de inhibición (K_i). Dependiendo de las características de la proteína diana así como del modo de inhibición (es decir, inhibición competitiva, no competitiva o mixta), se usa la ecuación adecuada para calcular la constante de inhibición (K_i). Comúnmente, K_i y CI50, medidas en las mismas condiciones de ensayo, del mismo inhibidor o dos inhibidores diferentes (I_1 y I_2) con el mismo mecanismo de acción pueden compararse como : $K_{i,1}/K_{i,2} = CI50_{,1}/CI50_{,2}$.

Por tanto en una realización, el método se usa para calcular características de unión cinética para el ligando y/o metabolito y/o receptor diana. En una realización, las características de unión cinética son K_d (constante de disociación), K_i (constante de disociación del inhibidor), CI50 (mitad de la concentración inhibidora máxima).

Las propiedades de unión son importantes con el fin de dilucidar y comprender el modo de acción del fármaco. Los mecanismos del fármaco son claves en el tratamiento de pacientes con cánceres, y están relacionados directamente con el aspecto de posible toxicidad, y la seguridad del paciente. Por tanto, el método de la invención puede proporcionar información de la interacción de fármaco-tejido detallada para un paciente individual. Por ejemplo, si un fármaco se une específicamente al tipo de tumor, y si el fármaco se une homogéneamente a todo el tejido tumoral, permitiendo por tanto métodos de tratamiento mejorados teniendo en cuenta al individuo, ayudando en la orientación del tratamiento en la biología de la enfermedad sumamente compleja.

Las propiedades de unión pueden estudiarse también usando una mezcla de más de un compuesto de fármaco (es decir, ligando) y compuesto con isótopos (es decir, ligando marcado) en una pareja. Esta mezcla de cóctel de fármacos proporciona capturas de imágenes únicas donde las propiedades de unión de la unión de un solo fármaco o múltiples fármacos se producen a lo largo de un transcurso de tiempo dado. La cinética de propiedades de unión específica se determina de ese modo mediante la información de especificidad de unión del fármaco y datos detallados.

En una realización, el método usa una mezcla de más de un par de ligando y ligando marcado, es decir, al menos un primer ligando y primer ligando marcado correspondiente, y un segundo ligando, y segundo ligando marcado correspondiente, para determinar la unión específica de un primer ligando y/o un segundo ligando que se unen reversiblemente a un sitio de unión en una muestra usando inhibición competitiva por desplazamiento.

La mezcla de cóctel de fármacos (es decir, ligando) puede incluir también múltiples fármacos que se unen a múltiples dianas de unión. Para tales mezclas, puede ser de alta importancia determinar que todos los constituyentes del cóctel se unen selectivamente al tejido tumoral, para ayudar a seleccionar un cóctel de fármacos eficaz, o para el caso donde un tratamiento que usa un cóctel de fármacos específico ha demostrado ser clínicamente eficaz pero teniendo efectos secundarios extensos, para optimizar un cóctel de fármacos para el tratamiento.

En una realización, el método usa una mezcla de más de un par de ligando y ligando marcado, es decir, al menos un primer ligando y primer ligando marcado correspondiente, que se unen a una primera diana, y un segundo ligando, y segundo ligando marcado correspondiente, que se unen a una segunda diana. Se usa inhibición competitiva por desplazamiento para determinar la unión específica del primer ligando y/o un segundo ligando.

El ligando marcado puede añadirse a un sistema donde la unión de ligando-receptor está ya en el, o próxima al, equilibrio tras la incubación. De este modo, el intercambio competitivo puede monitorizarse durante un transcurso de tiempo, proporcionando tanto información sobre la dispersión del fármaco en el tejido como posiblemente datos cinéticos no en equilibrio. En una realización, el método comprende (1) incubar una muestra de tejido con ligando no marcado, y después de eso (2) incubar dicha muestra de tejido con ligando marcado. Es decir, el ligando puede añadirse a la muestra de tejido en primer lugar (en un punto de tiempo) y el ligando marcado se añade en un momento posterior (en un segundo punto de tiempo). Tales experimentos pueden proporcionar más información con respecto a la penetración y distribución del fármaco en la muestra, y posiblemente información cinética adicional, tal como el tiempo de residencia (t_r) y la semivida ($t_{1/2}$) de un ligando unido, características que no son dependientes de la concentración y a menudo son importantes para la eficacia del fármaco.

Materiales y métodos

Los siguientes ejemplos son meros ejemplos y de ningún modo debe interpretarse que limitan el alcance de la invención. Más bien, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

Los tejidos de melanoma maligno humano congelados se extirparon de ganglios linfoides, constituyendo el tejido tumoral. Las secciones de tejido eran secciones con cortes de 10 μm (micrómetros) de grosor mediante el uso de un criostato, realizadas a -20ºC. Tras realizar las secciones, se descongelaron lentamente los cortes y se secaron a temperatura ambiente. Entonces, se sumergieron las secciones en metanol durante 5 min y se

secaron a temperatura ambiente. De manera correspondiente, se usó tejido sano humano congelado extirpado de ganglios linfoides como controles negativos.

Se realizó la incubación durante una hora usando vemurafenib no marcado a una concentración de 100 nM (nanomolar) para determinar la unión de la molécula de fármaco a su diana proteica. También se realizaron experimentos de coincubación con secciones tumorales de pacientes con una concentración de vemurafenib de 100 nM y un exceso de vemurafenib marcado con isótopos estables. El tiempo de incubación durante la unión competitiva fue de 1 hora. El tiempo de incubación puede variarse dependiendo del tipo de experimento realizado. Durante los experimentos de titulación, la concentración de vemurafenib marcado con isótopos estable fue de 100 nM, 1 μM, 10 μM y 100 μM (micromolar), respectivamente.

Las fórmulas estructurales de vemurafenib y el ^{13}C-vemurafenib marcado con isótopos estables se muestran en las figuras 4A y 4B.

Tras la incubación, se lavaron las secciones mediante PBS 3 veces y luego seguido por lavado con agua MilliQ 3 veces consecutivas.

Se obtuvieron los espectros de masas usando un instrumento MALDI LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific, Alemania). Se obtuvieron las señales del compuesto mediante el instrumento Orbitrap y la trampa de iones. Se realizó el análisis de imágenes usando ImageQuest (Thermo Scientific, Alemania). Para el análisis histológico, se realizaron tanto tinción de H&E como análisis inmunohistoquímico usando anticuerpo monoclonal contra BRAF V600E.

Se calculó la intensidad de unión identificando el área de unión a partir de la imagen de espectrometría de masas y la lectura de intensidad se calcula mediante el software ImageQuest del instrumento a partir de la señal y los datos de fondo.

Resultados

En la figura 6, una imagen de una sección de tejido de melanoma maligno humano tratada para experimentos de MSI muestra la morfología de disposición de una sola célula de las muestras de sección de tejido. La espectrometría de masas de desorción láser usada para identificar la localización del fármaco (vemurafenib) en el tejido canceroso tiene un diámetro del láser que captura imágenes a una potencia de resolución de 30 micrómetros en resolución espacial dentro de los compartimentos tisulares.

La figura 5 (A) muestra una imagen de MSI de una respuesta de señal de vemurafenib en modo de EM de una sección de tejido de melanoma maligno humano incubada con vemurafenib no marcado. La respuesta de señal de los iones de fragmentos primero y segundo generados a partir del ion original (EM/EM) de vemurafenib se muestra en las figuras 5 (B) y (C) respectivamente. En la figura 5 (D) se muestra una superposición de todas las señales (A-C).

En la figura 7 se muestran experimentos de coincubación. La figura 7 (A) muestra una imagen de histología de una sección de tejido de melanoma maligno humano de un paciente, y (B) una captura de imagen de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La figura 7 (D) muestra una imagen de histología de otra sección de tejido de melanoma maligno humano, y (C) experimentos de coincubación donde se administraron ^{13}C-vemurafenib 100 mM y vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La adición del compuesto marcado con isótopos (^{13}C-vemurafenib) muestra un intercambio competitivo de vemurafenib a i-vemurafenib, una sustitución que proporciona pruebas de unión del fármaco específica y selectiva. El tejido de control en este caso no tiene ninguna unión del fármaco medible (no mostrado).

La figura 8 (A) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (m/z 383,1) de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La sección de tejido (A) es un tejido de control negativo de un paciente (paciente 1) que carece de la mutación de BRAF V600F en la proteína diana BRAF. La figura 8 (B) muestra una captura de imagen para un paciente (paciente 2) con la mutación V600E en la proteína diana BRAF, con la respuesta de señal de vemurafenib (m/z 383,1) de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La figura 8 (C) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (m/z 389,1) de la sección de tejido del paciente 2 (con la mutación V600E en la proteína diana BRAF) donde se administraron vemurafenib 100 nM y ^{13}C-vemurafenib 1 μM dentro del tejido que desplaza por competición al vemurafenib 100 nM.

De manera similar, la figura 9 (A) muestra una captura de imagen para un paciente (paciente 3) con la mutación V600E en la proteína diana BRAF, con la respuesta de señal de vemurafenib (m/z 383,1) de una célula de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La figura 9 (B) es un tejido de control negativo de un paciente (paciente 4) que carece de la mutación de BRAF V600F en la proteína diana BRAF, y muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de vemurafenib (m/z 383,1) de una célula de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La figura 9 (C) muestra una

captura de imagen para un paciente (paciente 3) con la mutación V600E en la proteína diana BRAF, con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (m/z 389,1) de una célula de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM y ^{13}C-vemurafenib 1 μM dentro del tejido, que desplaza por competición al vemurafenib 100 nM.

El intercambio competitivo de vemurafenib a i-vemurafenib proporciona pruebas de la unión del fármaco específica y selectiva. Además, el intercambio competitivo puede proporcionar incluso más información. En las figuras 10 (A) a (D), se muestra un experimento de titulación por coincubación. La figura 10 (A) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (m/z 389,1) de una célula de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 nM dentro del tejido. La figura 10 (B) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (m/z 389,1) de una célula de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 1 μM dentro del tejido. La figura 10 (C) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (m/z 389,1) de una célula de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 10 μM dentro del tejido. Finalmente, la figura 10 (D) muestra una captura de imagen con la respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib (m/z 389,1) de la sección de tejido donde se administró vemurafenib 100 μM dentro del tejido. Las adiciones de compuesto marcado con isótopos (^{13}C-vemurafenib) muestran un intercambio competitivo de vemurafenib a i-vemurafenib, una sustitución que proporciona pruebas de la unión del fármaco específica y selectiva. La respuesta de señal de ^{13}C-vemurafenib se resume en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Unión competitiva de ^{13}C-vemurafenib frente a vemurafenib.

Conc. de isótopo	Señal de isótopo	Fondo
100 μM	259400	622
10 μM	29870	268
1 μM	3233	323
0,1 μM	326	165

La unión de ^{13}C-vemurafenib aumenta con niveles crecientes de administración. Esto indica claramente la relación lineal entre la concentración de fármaco de ^{13}C-vemurafenib y la unión a las células cancerosas, con un fondo de vemurafenib, tal como se muestra en la tabla 1. La especificidad de corte clara de la unión competitiva demuestra la especificidad de la unión del fármaco a las células cancerosas y la diana proteica, y la relación de señal/concentración puede usarse para calcular características de unión cinética para el ligando y/o metabolito y/o receptor diana.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a (a) realización/realizaciones específica(s), no se pretende que se limite a la forma específica expuesta en el presente documento. Más bien, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas y realizaciones distintas de las específicas anteriores son igualmente posibles dentro del alcance de estas reivindicaciones adjuntas, por ejemplo, diferentes de las descritas anteriormente.

En las reivindicaciones, el término “comprende/que comprende” no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Además, aunque se enumeran individualmente, pueden implementarse una pluralidad de medios, elementos o etapas del método mediante, por ejemplo, una sola unidad o procesador. Adicionalmente, aunque pueden incluirse características individuales en diferentes reivindicaciones, estas posiblemente pueden combinarse ventajosamente, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea viable y/o ventajosa. Además, las referencias en singular no excluyen una pluralidad. Los términos “un”, “una”, “primero”, “segundo”, etc. no excluyen una pluralidad. Los signos de referencia en las reivindicaciones se proporcionan simplemente como un ejemplo aclaratorio y no deben interpretarse como limitativos del alcance de las reivindicaciones de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

1. Método de determinación de la unión específica de un ligando que se une reversiblemente a un sitio de unión en una muestra de tejido usando inhibición competitiva por desplazamiento, comprendiendo el método incubar un ligando no marcado en ausencia de un ligando marcado sobre una primera muestra de tejido, incubar el ligando no marcado en presencia de un ligando marcado sobre una segunda muestra de tejido, siendo las muestras de tejido primera y segunda secciones adyacentes de la muestra; y posteriormente visualizar la localización del ligando usando espectrometría de masas de obtención de imágenes por MALDI en la muestra de tejido primera y segunda, respectivamente.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el ligando marcado es un ligando marcado con isótopos.

3. Método según la reivindicación 2, en el que el ligando marcado con isótopos es un ligando marcado con deuterio, o un ligando marcado con isótopo de ^{13}C.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración molar de ligando marcado es mayor que la concentración molar del ligando no marcado durante la inhibición competitiva por desplazamiento.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración molar de ligando marcado es de 5 a 10000 veces mayor que la concentración molar del ligando no marcado durante la inhibición competitiva por desplazamiento.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando no marcado es de concentración nanomolar y el ligando marcado con isótopos es de concentración micromolar.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando y ligando marcado son homólogos.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la localización de una proteína diana y la unión del isótopo se confirman mediante colocalización.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando y/o ligando marcado se cuantifican usando espectrometría de masas de obtención de imágenes por MALDI.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende incubar dicho ligando no marcado con al menos dos concentraciones diferentes de ligando marcado sobre secciones adyacentes de muestras de tejido.

11. Método según la reivindicación 10, en el que el método comprende usar una titulación de concentraciones diferentes de ligando marcado.

12. Método según la reivindicación 10 u 11, en el que las características de unión cinética para el ligando y/o metabolito y/o receptor diana se calculan a partir de los datos de unión.

13. Método según la reivindicación 12, en el que las características de unión cinética son K_d, K_i y/o CI50.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando se añade a la segunda muestra de tejido en primer lugar, en un punto de tiempo, y el ligando marcado se añade en un momento posterior, en un segundo punto de tiempo.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ligando es vemurafenib y el ligando marcado es ^{13}C-vemurafenib.

Fig. 1A

Fig. 1B

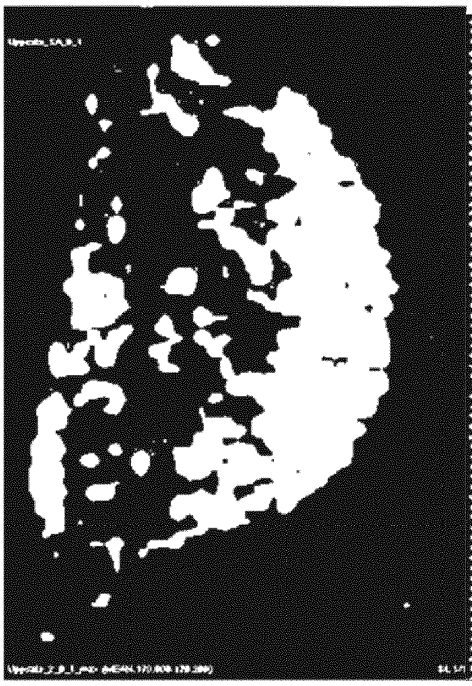


Fig. 1C

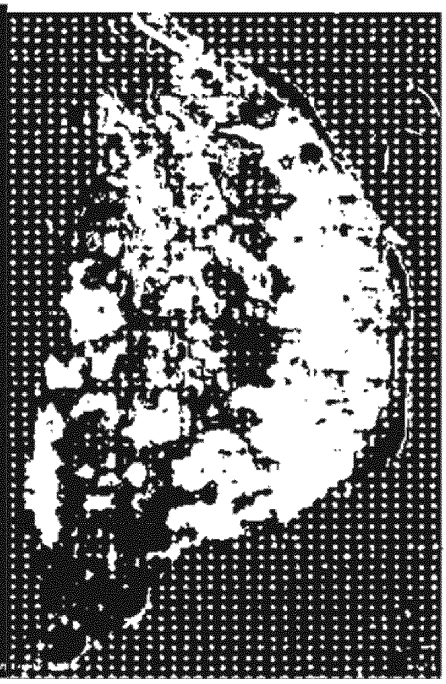


Fig. 1D

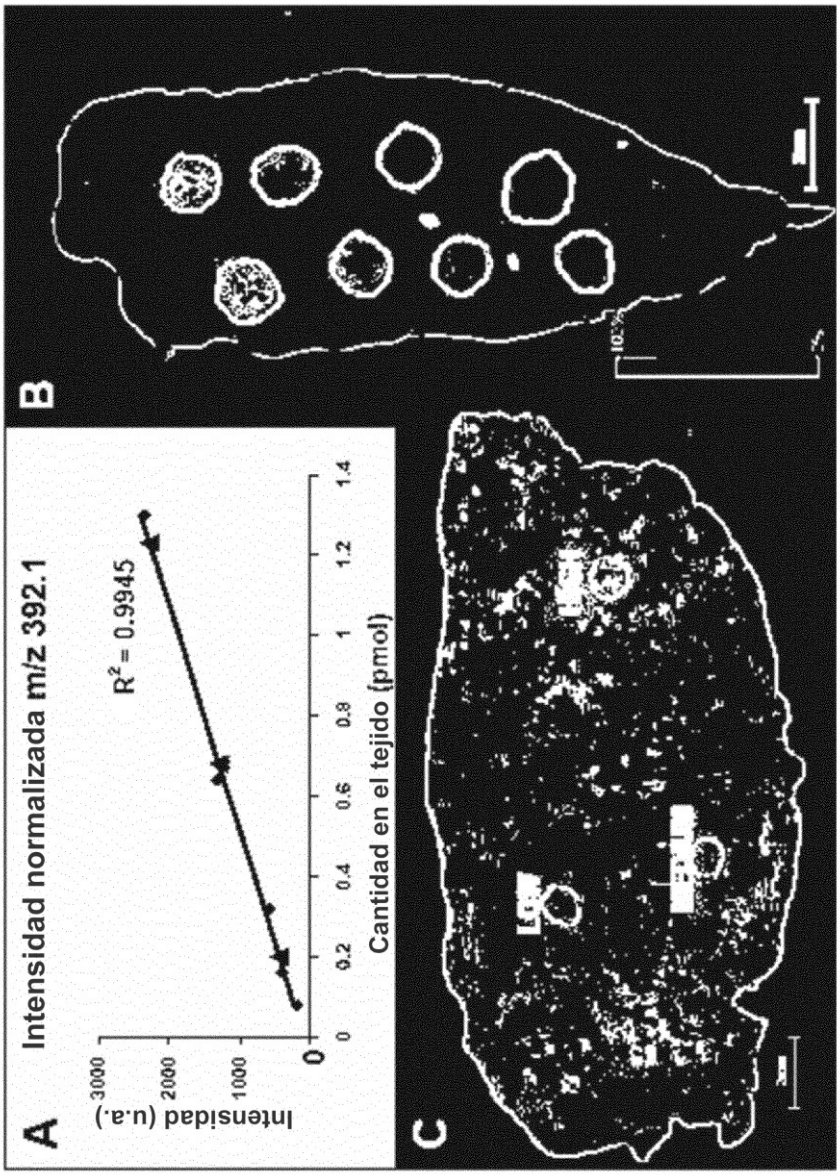

A
Intensidad normalizada m/z 392.1
R^2 = 0.9945
Intensidad (u.a.)
3000
2000
1000
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
Cantidad en el tejido (pmol)
B
C

Fig. 2

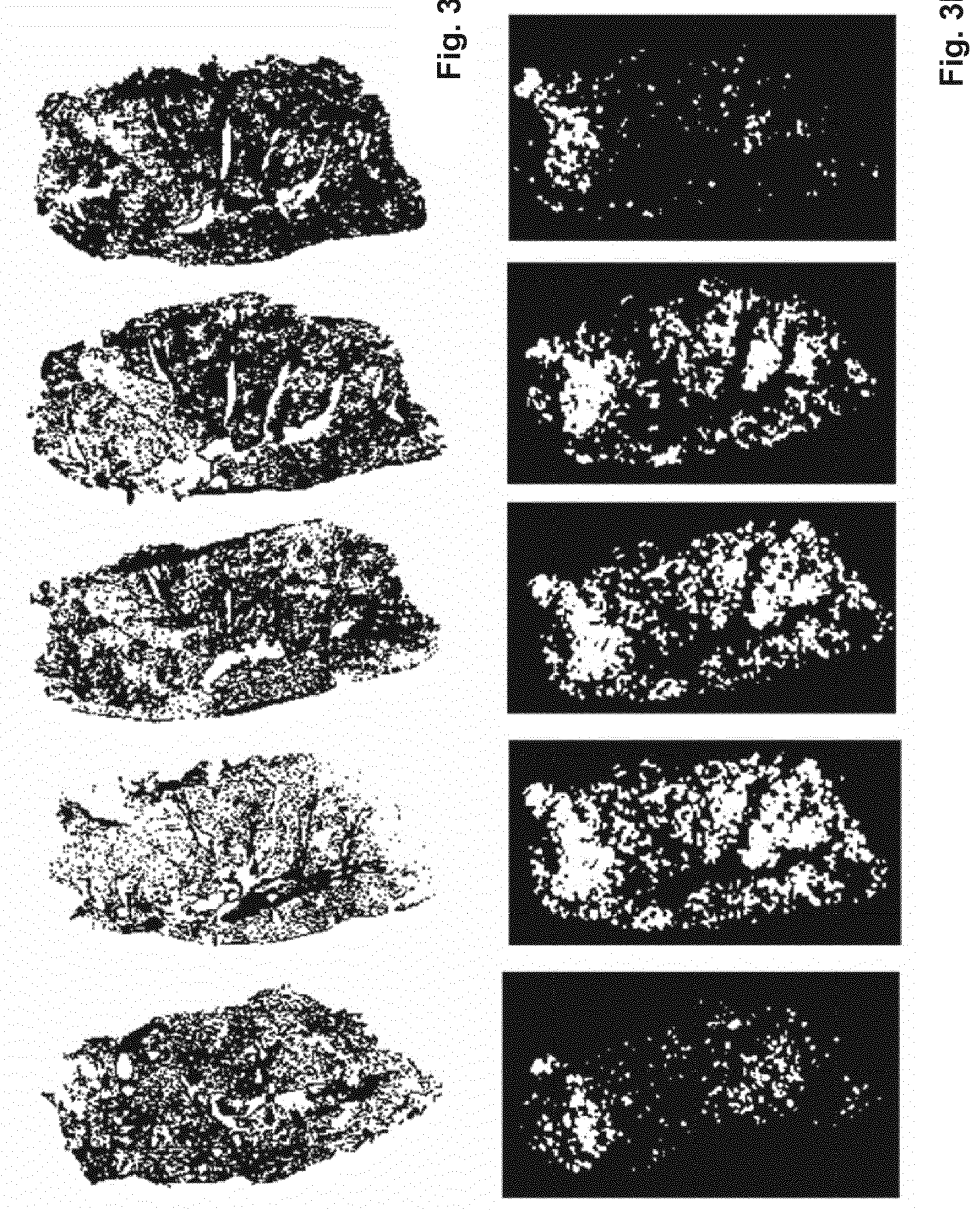


Fig. 3A

Fig. 3B

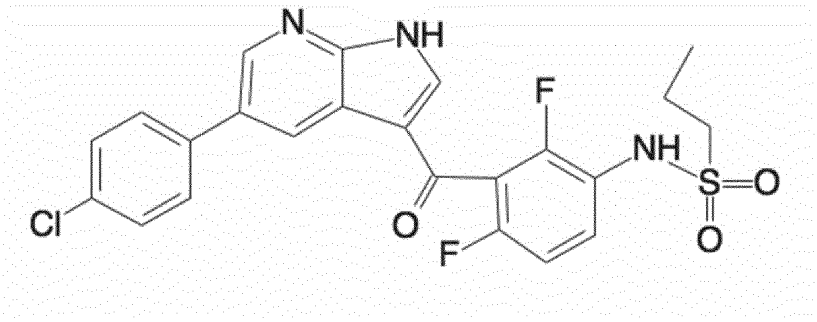


Fig. 4A

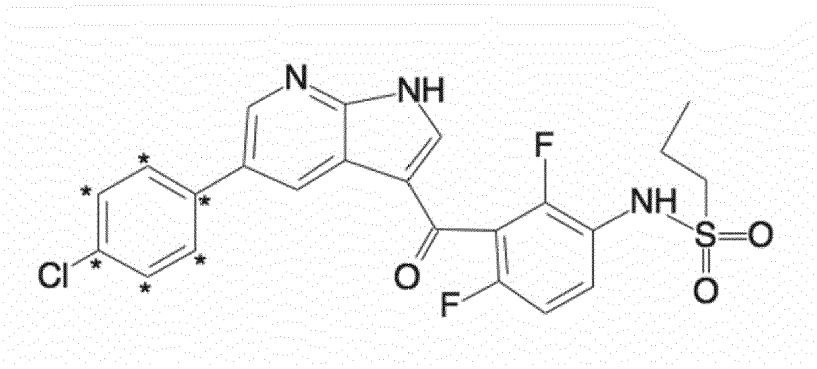


Fig. 4B

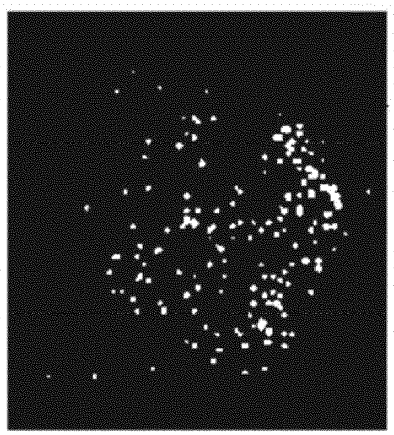


Fig. 5A

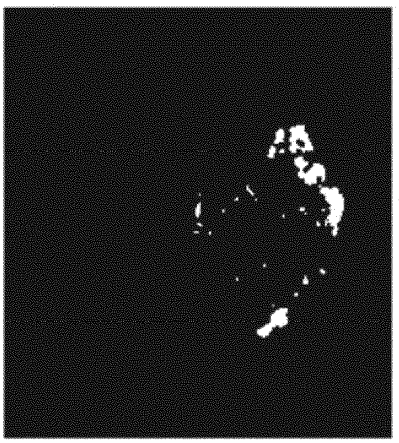


Fig. 5B

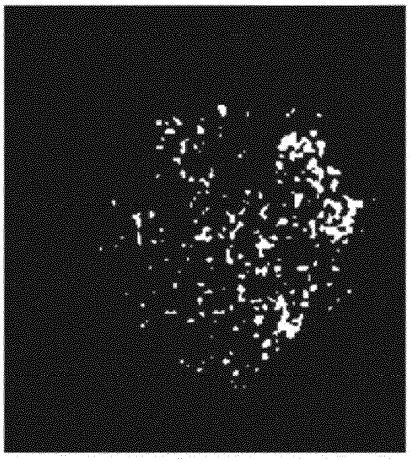


Fig. 5C

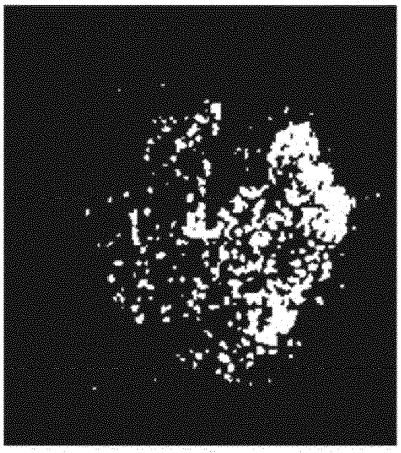


Fig. 5D

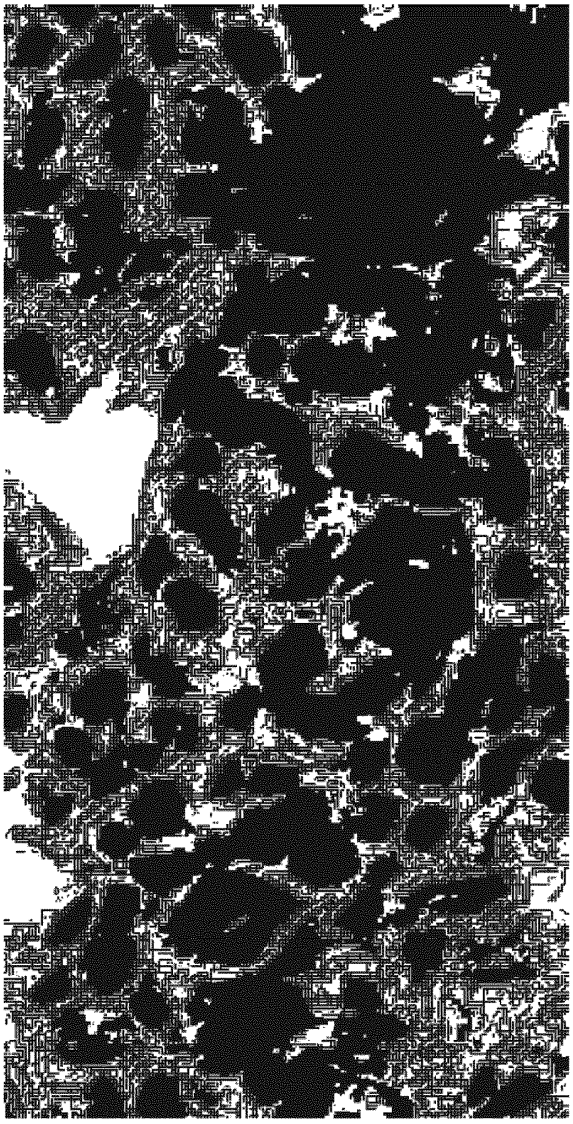


Fig. 6

Fig. 7A

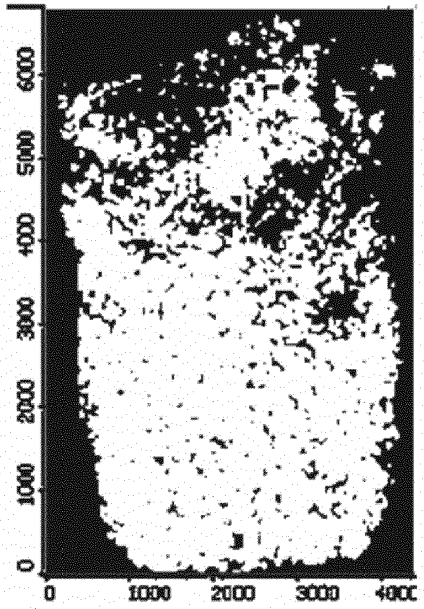


Fig. 7B

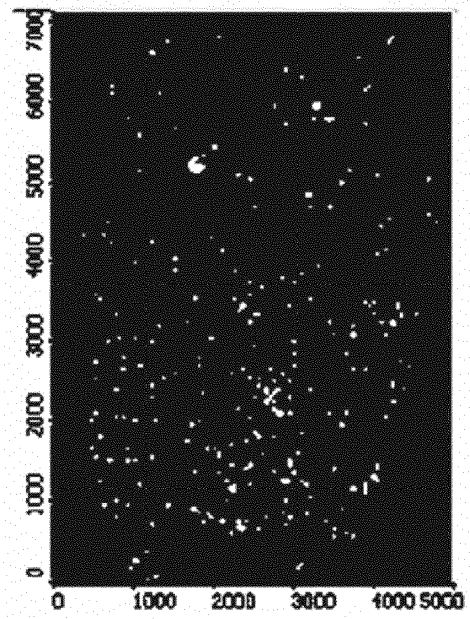
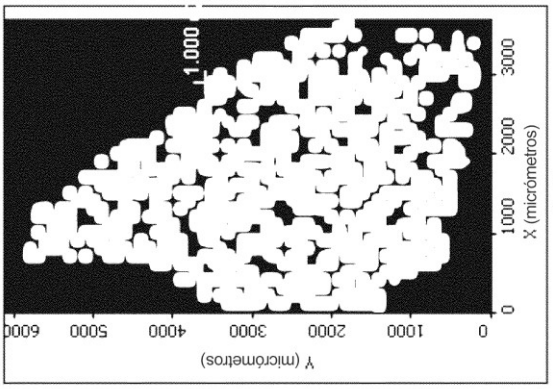
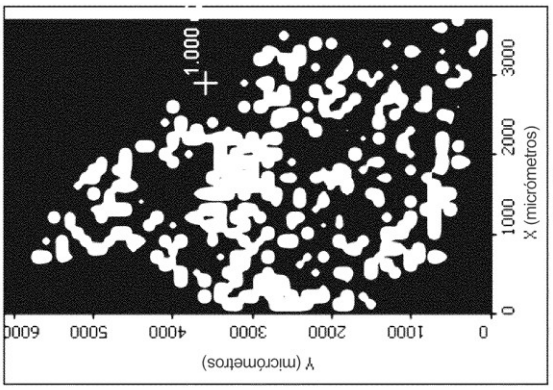


Fig. 7C

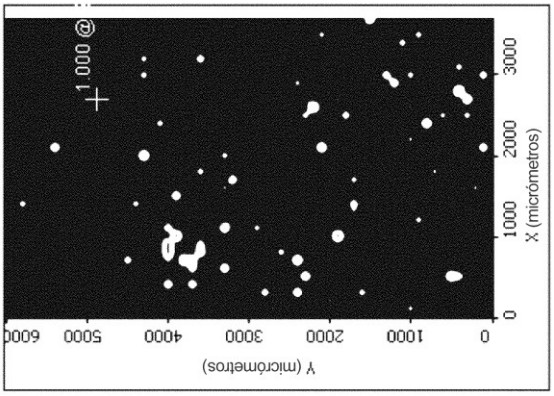
Fig. 7D



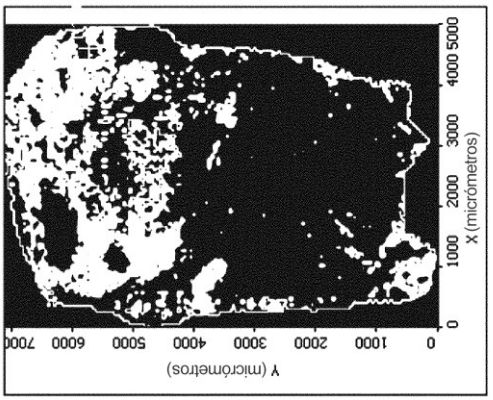
m/z 389.1 1 µM 13C vemurafenib **Fig. 8C**



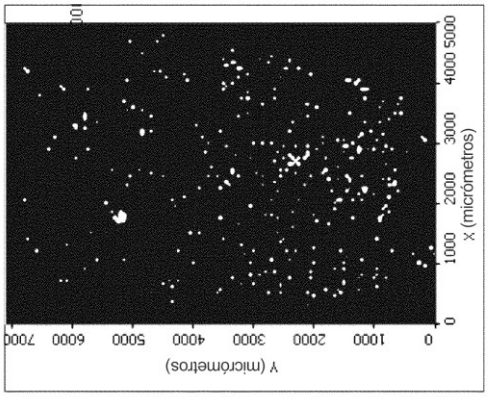
m/z 383.1 100 nM vemurafenib **Fig. 8B**



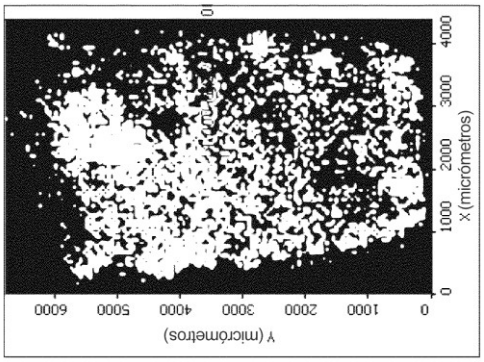
m/z 383.1 100 nM vemurafenib **Fig. 8A**



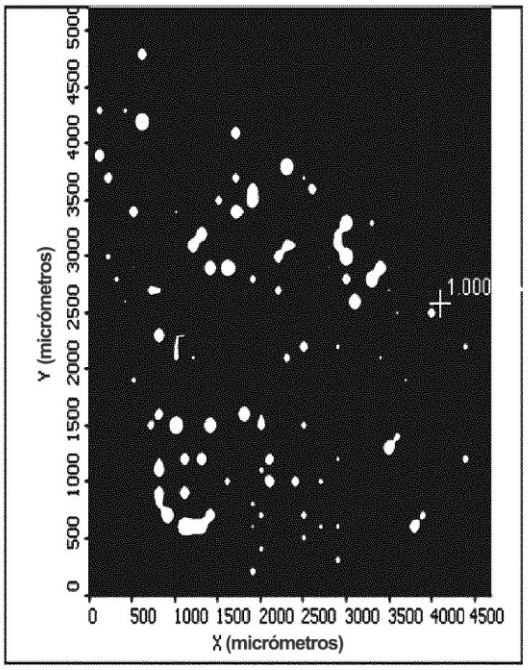
m/z 389.1 1 µM 13C vemurafenib **Fig. 9C**



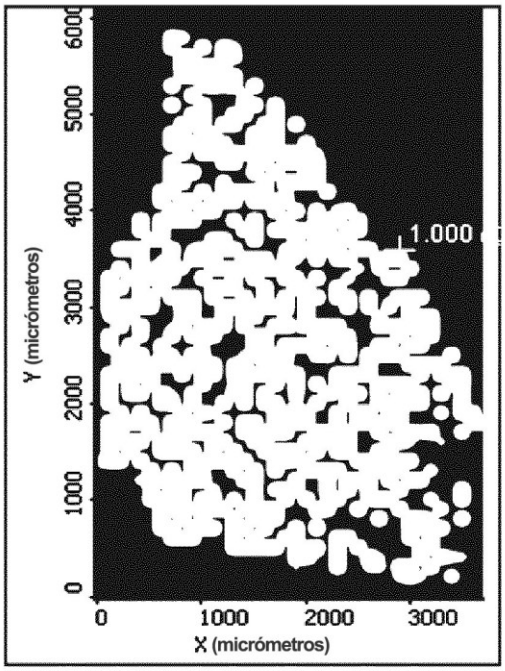
m/z 383.1 100 nM vemurafenib **Fig. 9B**



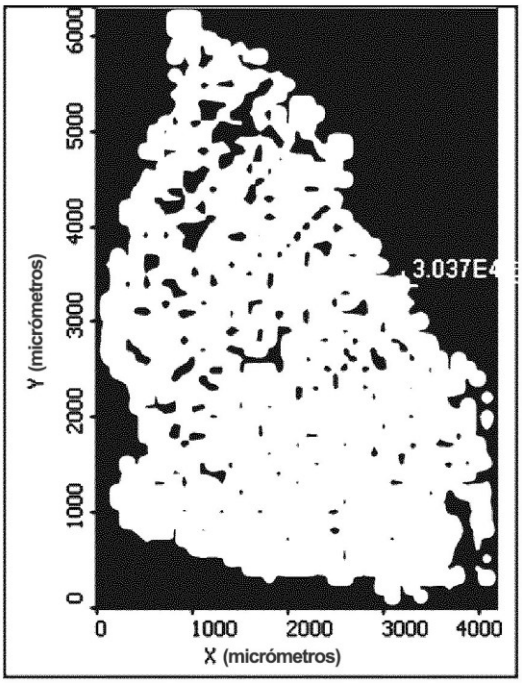
m/z 383.1 100 nM vemurafenib **Fig. 9A**



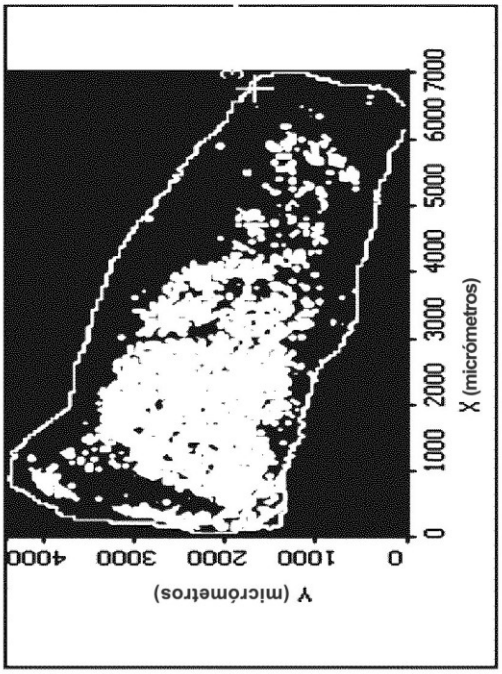
m/z 389.1 100 nM vemurafenib **Fig. 10A**



m/z 389.1 1 uM vemurafenib **Fig. 10B**



m/z 389.1 10 uM vemurafenib **Fig. 10C**



m/z 389.1 100 uM vemurafenib **Fig. 10D**