

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 231**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08855400 .1**
96 Fecha de presentación: **01.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2215480**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2010**

54 Título: **Herramienta de diagnóstico y terapéuticas para enfermedades que alteran la función vascular**

30 Prioridad:
30.11.2007 EP 07122043

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.08.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITEIT MAASTRICHT
DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY
MINDERBROEDERBERG 4-6
6211 LK MAATSTRICHT, NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT**

72 Inventor/es:
**VINK, Hans y
STROES, Erik Sjoerd Gerard**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 386 231 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

Herramientas de diagnóstico y terapéuticas para enfermedades que alteran la función vascular

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a herramientas y aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, particularmente útiles en enfermedades que afectan a la salud vascular y en enfermedades inflamatorias. En particular, dichas herramientas de diagnóstico y terapéuticas emplean una detección o modulación adecuada del glicocalix endotelial.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades vasculares representan una causa principal de la morbilidad y mortalidad en las sociedades humanas modernas. Mientras que trastornos cardiovasculares y cerebrovasculares tales como insuficiencia cardíaca congestiva y los episodios catastróficos de infarto de miocardio, muerte cardíaca repentina o apoplejía están ampliamente reconocidos, la disfunción vascular puede asimismo obstruir el suministro de sangre a otros órganos o partes del cuerpo tales como, por ejemplo, intestinos, riñones, extremidades superiores o inferiores (p. ej. enfermedad oclusiva arterial periférica).

15

20

Un componente etiológico principal de las enfermedades vasculares es la aterogénesis, es decir, la formación progresiva de placas ateromatosas en la capa subíntima, lo cual promueve lesiones ateroscleróticas inflamatorias dentro de las arterias y arteriolas. La deposición de placas puede conducir a estenosis arterial, provocando un suministro inadecuado de sangre a los órganos alimentados por la arteria. Más frecuentemente, la inflamación de la placa puede contribuir a la ruptura del tapón fibroso que resulta en la formación de trombos y el subsiguiente infarto.

25

30

La predisposición para la incidencia y/o velocidad de progreso de alteraciones patogénicas vasculares, que incluyen, *entre otros*, disfunción endotelial, permeabilidad vascular incrementada, agregación incrementada de leucocitos y plaquetas y, finalmente, la aterogénesis y aterosclerosis, puede ser aumentada en o asociada a diversos factores de riesgo o condiciones patológicas tales como, entre otros, a estados y enfermedades inflamatorias agudas y crónicas y con estimulaciones vasculares crónicas. Por ejemplo, pacientes con trastornos inflamatorios crónicos tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico pueden padecer una aterogénesis acelerada (Solomon *et al.* 2003, *Circulation* 107: 1303-7; Roman *et al.* 2003, *N Engl J Med* 349: 2399-406); niveles elevados de endotoxina en el torrente sanguíneo humano han sido asociados a un riesgo incrementado de aterosclerosis (Stoll *et al.* 2004, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2227-36); y la administración repetida de endotoxina ha demostrado incrementar la formación de lesiones ateroscleróticas en conejos en una dieta hipercolesterolémica (Lehr *et al.* 2001, *Circulation* 104: 914-20); e incluso estimulaciones inflamatorias sencillas tales como vacunación, infusión de proteínas C-reactivas o la administración de endotoxina puede provocar una disfunción endotelial en seres humanos.

35

40

Por consiguiente, existe una necesidad urgente de herramientas de diagnóstico capaces de detectar la vulnerabilidad de las paredes de los vasos a estímulos aterogénicos, particularmente en sujetos y grupos de pacientes que pueden estar en riesgo de desarrollar alteraciones vasculares o de los que se sospecha o conoce que padecen una patología vascular. Además de ello, también existe una necesidad de nuevos objetivos que permitan aumentar la capacidad protectora de las paredes de los vasos frente a estímulos aterogénicos, proporcionando con ello medidas terapéuticas y preventivas adicionales.

45

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención acomete las necesidades arriba discutidas en la técnica.

50

Más específicamente, la invención enseña herramientas de diagnóstico adicionales para detectar una vulnerabilidad y patogénesis vascular. Dichas herramientas de diagnóstico pueden suponer preferiblemente una o más ventajas frente a estrategias de diagnóstico previamente conocidas a la patología vascular tales como, por ejemplo, una mayor velocidad, sensibilidad, especificidad y/o simplicidad de detección, una detección más temprana de cambios patológicos vasculares, una detección simultánea de múltiples parámetros relevantes, detección a partir de menos material de partida o a partir de material de partida obtenido por técnicas menos invasivas o no invasivas.

55

En particular, los autores de la presente invención han demostrado de forma concluyente que estimulaciones que fomentan el desarrollo de una vulnerabilidad y enfermedad vascular – tales como, por ejemplo, estimulaciones inflamatorias – provocan alteraciones demostrables en el glicocalix endotelial tales como, por ejemplo, un volumen o dimensión del glicocalix sistémico y microvascular reducido, una permeabilidad incrementada del glicocalix, la diseminación de componentes del glicocalix tales como hialuronano y sulfato de heparano, y niveles alterados de enzimas que participan en el metabolismo del glicocalix.

60

También, a la vista de la importancia de la integridad endotelial (incluidas las funciones del glicocalix) para la salud

5 vascular, los autores de la invención contemplan, así, que la vigilancia de parámetros o marcadores relacionados con el glicocalix puede proporcionar una información valiosa sobre el riesgo o la presencia de disfunción y enfermedad vascular, así como la susceptibilidad aterogénica a estimulaciones inflamatorias. Además, los autores de la invención contemplan también que intervenciones profilácticas y/o terapéuticas, dirigidas a proteger y/o reconstituir la integridad del glicocalix (por ejemplo, volviendo a abastecer constituyentes del glicocalix, estimulando la acumulación del glicocalix o inhibiendo la disgregación del glicocalix) puede prevenir o mejorar el pronóstico de disfunción y enfermedades vasculares, así como de inflamación y de la susceptibilidad aterogénica a estimulaciones inflamatorias.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método *ex vivo* para evaluar el estado del glicocalix tal como se esboza en las reivindicaciones. La invención proporciona también un método *ex vivo* para diagnosticar una enfermedad vascular o la susceptibilidad a una enfermedad vascular en un sujeto, que comprende detectar en dicho sujeto una alteración en el estado del glicocalix, determinada de acuerdo con el método de la reivindicación 1.

15 A modo de ejemplo y no de limitación, las alteraciones en estos aspectos de la homeostasis del glicocalix se pueden comparar con un sujeto o sujetos testigos que no padecen una enfermedad vascular ni son susceptibles a una enfermedad vascular, para evaluar si se produce una diferencia significativa que puede ser indicativa del fenotipo patológico.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método *ex vivo* para diagnosticar la susceptibilidad aterogénica a estímulos inflamatorios en un sujeto, que comprende detectar en dicho sujeto una alteración en el estado del glicocalix según se detalla en la reivindicación 7.

25 A modo de ejemplo y no de limitación, alteraciones en estos aspectos de la homeostasis del glicocalix se pueden comparar con un sujeto o sujetos testigos no expuestos a estimulaciones inflamatorias para confirmar si se produce una diferencia significativa que puede ser indicativa del fenotipo patológico.

30 Dicha perturbación en el estado, volumen o dimensión del glicocalix, permeabilidad del glicocalix, diseminación del glicocalix y/o la actividad de una o más enzimas del metabolismo del glicocalix se puede detectar, sin limitación, en vasos sanguíneos individuales (tales como, p. ej., en arterias o arteriolas individuales) al nivel de tejidos, partes del cuerpo, órganos y/o al nivel sistémico.

35 Preferiblemente, en los métodos de diagnóstico arriba definidos, en una muestra biológica tomada de un sujeto se pueden realizar mediciones necesarias para determinar el estado, volumen o dimensión del glicocalix, la permeabilidad del glicocalix, la diseminación del glicocalix y/o la actividad de una o más enzimas del metabolismo del glicocalix. Ensayos *in vitro* de este tipo son fáciles generalmente de realizar y están sujetos a un análisis de alto rendimiento. Muestras adecuadas incluyen, sin limitación, muestras de sangre entera, plasma o suero obtenidas de un sujeto. Estos fluidos corporales están en contacto directo *in vivo* con el tejido endotelial vascular y, por lo tanto, son los responsables de la perturbación del glicocalix. Además de ello, al menos algunos indicadores del glicocalix tales como, por ejemplo, pero sin limitación, proteínas similares a lectina asociadas con el glicocalix, también se pueden detectar en muestras de orina.

45 La perturbación del glicocalix se ha de diagnosticar en muestras tomadas de sujetos tales como, p. ej., muestras de sangre, plasma o suero, que comprende detectar en dichas muestras la presencia y/o concentraciones de, *entre otras*, moléculas derivadas del glicocalix tales como, p. ej., oligosacáridos o polisacáridos, glicosaminoglicanos, hialuronano, sulfato de heparano o proteoglicanos; enzimas que catalizan el anabolismo o catabolismo del glicocalix tales como, p. ej., hialuronidasa; y/o sustancias endógenas o exógenas (p. ej. infundidas) que pueden quedar incorporadas o asociadas de otro modo con el glicocalix y que, así, pueden proporcionar información sobre el volumen o la dimensión del glicocalix (sistémico) y/o su accesibilidad molecular. A modo de ejemplo, pero sin limitación, perfiles de proteínas similares a lectina endógenas que normalmente se asocian con el glicocalix, según se determinan en muestras, p. ej. en muestras de plasma u orina, pueden proporcionar una información adecuada sobre el volumen o dimensión del glicocalix y/o su accesibilidad molecular. A modo de ejemplo y sin limitación, alteraciones en los indicadores o marcadores de la homeostasis del glicocalix tal como se ha establecido antes se pueden comparar con un sujeto o sujetos testigos para evaluar si se produce una diferencia significativa que puede ser indicativa de un fenotipo patológico.

60 En esta memoria se describe que la presencia y/o concentración de los marcadores anteriores u otros marcadores del glicocalix se puede detectar, secuencial o simultáneamente, mediante tecnologías de ensayo conocidas en la técnica tales como inmunoprecipitación, análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayos de actividad enzimática colorimétricos y fluorimétricos, etc.

En la presente invención, el estado del glicocalix se puede determinar por un método de distribución por tamaños en

5 el que se determina la dimensión del glicocalix endotelial de vasos sanguíneos capilares individuales o la anchura del glicocalix (GW – siglas en inglés). Adicionalmente, el método de distribución por tamaños también puede proporcionar medidas para la anchura de los glóbulos rojos (RBCW – siglas en inglés) en los vasos sanguíneos, el diámetro de los vasos (VD – siglas en inglés) y la reserva de volumen capilar (CVR – siglas en inglés). Por lo tanto, del sujeto de ensayo no se han de tomar muestras. El uso del método y la tecnología de distribución por tamaños puede proporcionar una o más ventajas tales como, por ejemplo, la velocidad de rendimiento, estrés reducido en pacientes y personal recolector de muestras; detección a bajo coste, comparación automatizada con referencias, aparatos portátiles, detección más rápida; y/o la elusión de técnicas basadas en laboratorio laboriosas y que demandan una logística, y personal; etc. Una ventaja adicional del método y aparato de la presente invención es la vigilancia individualizada en el hogar, permitiendo una observación (semi)-permanente del estado, por ejemplo a través de una conexión a una estación de trabajo centralizada y/u operada. Por consiguiente, la invención proporciona el diagnóstico de una enfermedad vascular o susceptibilidad aterogénica a estimulaciones inflamatorias en sujetos.

15 Los autores de la invención describen también en esta memoria un dispositivo monitor del glicocalix (GM – siglas en inglés), configurado para detectar el estado del glicocalix y/o la influencia de compuestos sobre el estado del glicocalix tales como, por ejemplo, enzimas que catalizan el anabolismo o catabolismo del glicocalix, y/o una sustancia endógena o exógena que puede quedar incorporada o asociada de otro modo con el glicocalix tal como, p. ej., proteínas similares a lectina endógenas que normalmente se asocian con el glicocalix.

20 Los autores de la invención describen también en esta memoria un kit que comprende el dispositivo monitor del glicocalix arriba definido, software y, opcionalmente, uno o más tampones, reactivos, analitos de calibración, testigo positivo y/o negativo y/o instrucciones de uso, requeridos para realizar un método de diagnóstico utilizando dicho monitor del glicocalix.

25 También se describe en esta memoria que la presencia y/o concentración de los marcadores del glicocalix anteriores u otros se puede detectar, secuencial o simultáneamente, utilizando un dispositivo biosensor. Los biosensores combinan de manera favorable un componente biológico sensible y específico (tal como, p. ej., un receptor con elevada afinidad y especificidad para la unión con un analito a ser detectado; o una enzima que cataliza una reacción que implica un analito a ser detectado; o un sustrato de una enzima a ser detectada) con un componente detector físico, químico o físico-químico que permite vigilar el episodio biológico (tal como, p. ej., dicha unión o reacción). El uso de la tecnología del biosensor puede proporcionar una o más ventajas tales como, por ejemplo: el uso de volúmenes de muestra menores, los cuales pueden incrementar el rendimiento y disminuir el estrés en pacientes y personal recolector de muestras; la posibilidad de detección simultánea de dos o más marcadores en una muestra; una detección desechable, portátil y potencialmente de bajo coste; detección más rápida; y/o elusión de técnicas basadas en laboratorio, laboriosas y que demandan logística; etc.

40 Los autores de la invención describen también un dispositivo biosensor configurado para detectar, en una muestra tomada de un sujeto, la presencia y/o concentraciones de una molécula derivada del glicocalix, una enzima que cataliza al anabolismo o el catabolismo del glicocalix y/o una sustancia endógena o exógena que puede quedar incorporada o asociada de otro modo con el glicocalix tal como, p. ej., proteínas similares a lectina endógenas que normalmente se asocian con el glicocalix.

45 Se describe también un kit que comprende el dispositivo biosensor antes definido y, opcionalmente, uno o más tampones, reactivos, analitos de calibración, testigo positivo y/o negativo y/o instrucciones para el uso, requeridos para realizar un método de diagnóstico utilizando dicho dispositivo biosensor.

50 También se describe el uso del dispositivo biosensor según se define antes o un kit que comprende el mismo en los métodos de diagnóstico de la invención arriba definidos para diagnosticar una enfermedad vascular o susceptibilidad aterogénica a estimulaciones inflamatorias en sujetos.

El estado del glicocalix se puede vigilar o determinar por el método de distribución por tamaños de la presente invención, que es un método no invasivo. Preferiblemente, el método de distribución por tamaños se realiza con un monitor del glicocalix.

55 Debe apreciarse que los métodos de diagnóstico anteriores se pueden utilizar en combinación o en sincronismo, particularmente para ajustar ventajosamente el tratamiento a pacientes individuales. Por ejemplo, en los casos en los que un ensayo de diagnóstico como antes determina que uno o más constituyentes del glicocalix particulares están disminuidos de manera significativa en un paciente, el tratamiento en dicho paciente puede lograrse subsiguientemente reabasteciendo dicho o dichos constituyentes. En otro ejemplo, en el que un ensayo de diagnóstico como el de arriba determina que una o más enzimas degradantes del glicocalix particulares son supra-activas en un paciente, el tratamiento en dicho paciente puede luego dirigirse a inhibir dicha o dichas enzimas. Por consiguiente, en realizaciones, sobre la base de los ensayos de diagnóstico de la invención se puede determinar o

decidir una intervención profiláctica o terapéutica adecuada según se define en esta memoria.

También, los métodos y dispositivos de diagnóstico (p. ej. biosensores, método de distribución por tamaños y/o el monitor del glicocalix) se pueden utilizar para vigilar, incluso en pacientes individuales, la eficacia de cualesquiera intervenciones terapéuticas en enfermedades vasculares o inflamación (p. ej. de tratamientos tal como se describen en esta memoria; u otros tratamientos tales como, *entre otros*, medicación para mejorar la sensibilidad a insulina en pacientes diabéticos, terapia con heparina en pacientes de cáncer, tratamientos existentes diseñados para mejorar la función endotelial en enfermedades inflamatorias, etc.), con respecto al estado del glicocalix y parámetros tales como volumen o dimensión, permeabilidad, distribución, actividad de enzimas metabólicas del glicocalix, etc.

Tal como se señala, la inflamación tiende a aumentar las posibilidades de desarrollar una patología vascular. Por lo tanto, en una realización, los métodos de diagnóstico ex vivo arriba definidos para determinar la presencia de o el riesgo a una enfermedad vascular, o para determinar la susceptibilidad aterogénica a estimulaciones inflamatorias puede ser particularmente útil en sujetos con inflamación, por ejemplo en pacientes con una afección o enfermedad inflamatoria.

Tal como se ha señalado también, la patología vascular puede asociarse con una diversidad de factores de riesgo y estimulaciones tales como estimulaciones vasculares crónicas. Así, en una realización, los métodos de diagnóstico arriba definidos para determinar la presencia de o el riesgo a una enfermedad vascular y/o los tratamientos arriba definidos de enfermedades vasculares que implican la modulación del glicocalix, pueden ser particularmente útiles en sujetos con uno o más factores de riesgo elegidos de la edad, fumar, hiperglucemia y dislipidemia; y/o en sujetos con una o más patologías de riesgo elegidas de lesión por isquemia-reperfusión, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, hiperglucemia, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, dislipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, cáncer, enfermedad infecciosa y trauma.

Estos y aspectos adicionales y realizaciones preferidas de la invención se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones anejas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1a. Los volúmenes del glicocalix sistémicos se determinaron antes y después de la estimulación con endotoxina, sin o con tratamiento previo con Etanercept. Los datos se presentan como media \pm EMT, * $p < 0,05$, # $p < 0,01$.

Figura 1b. Curvas de aclaramiento de plasma y Dextran 40 por debajo de los valores de referencia (rombos en blanco; rombos en negro) en el grupo de solución salina (cuadrados en negro) y de Etanercept (cuadrados en blanco). 4 horas después de la infusión de endotoxina, la tasa de aclaramiento de Dextran 40 y plasma se incrementó en el grupo de solución salina en comparación con el grupo de Etanercept. Los valores representados en cada instante se expresan como media \pm EMT.

Figuras 1c y 1d ilustran el efecto de LPS (endotoxina) sobre la dimensión del glicocalix, según se determina mediante representación en imágenes directa de capilares sublinguales individuales. Las dimensiones del glicocalix capilar se determinaron antes (1c) y después (1d) de la estimulación con endotoxina. El eje X muestra la dimensión del glicocalix capilar (en micras).

Figura 2. Niveles de hialuronano en plasma (Figura 2a) y la actividad de hialuronidasa (Figura 2b) en voluntarios humanos estimulados con endotoxina sin (puntos) o con tratamiento previo con Etanercept (rombos). Los datos se presentan como medias \pm EMT (* $p < 0,05$ frente a los valores de referencia, # $p < 0,05$ entre grupos).

Figura 3. Los marcadores de inflamación se evaluaron mediante los niveles en plasma de IL-6 (Figura 3a, sin (puntos) o con (rombos) tratamiento previo con Etanercept y niveles de CRP en plasma (Figura 3b, sin (barras en negro) y con (barras en blanco) tratamiento previo con Etanercept) durante la estimulación con endotoxina en voluntarios humanos. Se representan los parámetros activación de la coagulación (Figura 3c) según se evalúa mediante fragmentos de protrombina 1+2) y fibrinolisis (Figura 3d, determinada por niveles de dímeros D); (puntos: LPS + solución salina, rombos: LPS + Etanercept). Los datos se presentan como media \pm EMT (* $p < 0,05$ frente a los valores de referencia, † $p < 0,01$ frente a los valores de referencia, # $p < 0,05$ entre grupos).

Figura 4. Representación del método de medición de la presente invención, comparado con métodos de medición de la técnica anterior.

Figura 5. Representación del diámetro del vaso en función de la anchura de los glóbulos rojos medida (Fig. 5a), la anchura del glicocalix (Fig. 5b) y el cambio en la anchura del glicocalix con respecto a testigos sanos (Fig. 5c) en presencia y ausencia de nitroglicerol.

Figura 6. Representación del diámetro de los vasos en función de la anchura de los glóbulos rojos medida (Fig. 6a) y la anchura del glicocalix (Fig. 6b) en sujetos testigos sanos y sujetos con cáncer y cambio en la anchura del glicocalix con relación a testigos sanos (Fig. 6c).

5 **Figura 7.** Representación del diámetro de los vasos en función de la anchura de los glóbulos rojos medida (Fig. 7a) y la anchura del glicocalix (Fig. 7b) en sujetos testigos sanos y sujetos con cáncer tras tratamiento con un compuesto inhibidor del receptor VEGF y cambio en la anchura del glicocalix con relación a testigos sanos (Fig. 7c).

10 **Figura 8.** Representación del diámetro de los vasos en función de la anchura de los glóbulos rojos medida (Fig. 8a) y la anchura del glicocalix (Fig. 8b) en sujetos testigos sanos y sujetos diabéticos, y cambio en la anchura del glicocalix con relación a testigos sanos (Fig. 8c).

15 **Figura 9.** Representación del diámetro de los vasos en función de la anchura de los glóbulos rojos medida (Fig. 9a) y la anchura del glicocalix (Fig. 9b) en sujetos testigos sanos y sujetos diabéticos tras tratamiento con un compuesto glicomimético, y cambio en la anchura del glicocalix con relación a testigos sanos (Fig. 9c).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen tanto los referentes en singular como en plural, a menos que el contexto lo dictamine claramente de otra forma.

25 Los términos y expresiones “que comprenden”, “comprende” y “constituido por”, tal como se utiliza en esta memoria son sinónimos con “que incluyen”, “incluye” o “que contiene”, “contiene” y son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método adicionales, no reseñados. Se apreciará que los términos “que comprenden”, “comprende” y “constituido por”, tal como se utilizan en esta memoria, comprenden los términos o expresiones “que consiste en”, “consiste” y “consiste en”.

30 La reseña de intervalos numéricos mediante puntos extremos incluye todos los números y fracciones sub-sumados dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos finales reseñados.

35 El término “aproximadamente”, tal como se utiliza en esta memoria cuando se alude a un valor mensurable tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de +/-10% o menores, preferiblemente +/- 5% o menores, más preferiblemente +/-1% o menores y, todavía más preferiblemente, +/-0,1% o menores de y a partir del valor especificado, en la medida en que estas variaciones sean apropiadas para realizar la invención descrita. Ha de entenderse que el valor al que la modificación “aproximadamente” se refiere también está específicamente, y, preferiblemente, descrita por sí misma.

40 Todos los documentos citados en la presente memoria descriptiva se incorporan con ello como referencia en su totalidad.

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones utilizados en la descripción de la invención, incluidos términos y expresiones técnicos y científicos tienen el significado como habitualmente es entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Por medio de una guía adicional, las definiciones de los términos y expresiones se incluyen para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

50 Los términos “sujeto” o “paciente” se refieren preferiblemente a animales, más preferiblemente a animales homeotermos, todavía más preferiblemente vertebrados, e incluso más preferiblemente mamíferos que incluyen específicamente seres humanos y mamíferos no humanos, que han sido objeto de tratamiento, observación o experimentación. El término “mamífero” incluye cualquier animal clasificado como tal que incluye, pero no se limita a seres humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, animales para eventos deportivos, animales mascota, animales de compañía y animales experimentales tales como, por ejemplo, ratones, ratas, hámsters, conejos, perros, gatos, cobayas, ganado bovino, vacas, ovejas, caballos, cerdos y primates, p. ej. monos y simios. Particularmente preferidos son sujetos humanos, incluidos los de ambos sexos y todas las categorías de edad de los mismos.

60 Tal como se utiliza en esta memoria, una frase tal como “un sujeto que necesita tratamiento” incluye sujetos que se beneficiarían del tratamiento de una afección dada tal como una enfermedad vascular o inflamación. Sujetos de este tipo pueden incluir, sin limitación, aquellos a los que se ha diagnosticado dicha afección, aquellos que son propensos a desarrollar dicha afección y/o aquellos en los que se ha de prevenir dicha afección.

El término “muestra” se refiere generalmente a material, en forma no purificada o purificada, obtenido de una fuente biológica. Una muestra biológica puede ser tomada típicamente de su fuente biológica tal como de un sujeto de interés, por métodos apropiados para la toma, extracción, biopsia o resección, etc., de fluidos corporales, tejidos, células o similares. Muestras particularmente útiles en la presente invención incluyen sangre entera, plasma, suero y orina derivada de sujetos. Una muestra biológica se puede procesar adicionalmente para preparar derivados adecuados de la misma tales como, sin limitación, lisados de células o tejidos, homogeneizados, sobrenadantes, fracciones, etc. Una muestra se puede subdividir para aislar o enriquecer partes de la misma, (tales como, por ejemplo, partes de las que se espera contengan analitos de interés) a utilizar en los métodos de diagnóstico de la invención. Así, una muestra se puede aplicar a los métodos de la invención directamente o se puede procesar, extraer o purificar hasta grados variables antes de ser utilizada.

Afecciones patológicas

Tal como se señala en la sección “Sumario”, la invención describe métodos de diagnóstico, particularmente útiles en enfermedades vasculares e inflamación. En particular, las enfermedades vasculares y la inflamación se pueden caracterizar, adicionalmente, por el estado del glicocalix.

La expresión “enfermedad vascular”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o afección que afecta al sistema vascular, incluido el corazón y los vasos sanguíneos. Enfermedades vasculares incluyen, sin limitación, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades vasculares periféricas, aterosclerosis y enfermedades vasculares arterioscleróticas. La expresión comprende lesiones vasculares pre-sintomáticas así como disfunciones vasculares que provocan síntomas manifiestos. Por ejemplo, el término incluye disfunción vascular pre-sintomática y sintomática provocada por estenosis, oclusión o aneurisma de vasos sanguíneos debido al desarrollo de ateromas y placas ateroscleróticas, y enfermedades y trastornos que resultan de ellas. Ejemplos particulares de enfermedades vasculares incluyen, sin limitación, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria (CAD – siglas en inglés), muerte cardíaca repentina, infarto de miocardio, isquemia, apoplejía, enfermedades vasculares periféricas tales como la enfermedad arterial periférica oclusiva (PAOD – siglas en inglés), tromboembolismo venoso y embolismo pulmonar.

El término “susceptibilidad”, con referencia a una enfermedad, designa la susceptibilidad, probabilidad, vulnerabilidad o predisposición de un sujeto a una enfermedad tal como, por ejemplo, una enfermedad vascular.

El término “inflamación” tiene la designación dada al mismo en la técnica. Por medio de una guía adicional, el término generalmente se refiere a un respuesta en tejidos vascularizados a una lesión celular o tisular provocada habitualmente por agentes físicos, químicos y/o biológicos, que está marcada en la forma aguda por las secuencias clásicas de dolor, calor, rubor, hinchazón y pérdida de función, y que sirve como un mecanismo que inicia la eliminación, dilución o encapsulación de agentes nocivos y/o tejido dañado. La inflamación implica, histológicamente, una serie compleja de episodios, que incluyen la dilatación de las arteriolas, capilares y vénulas con permeabilidad y flujo de sangre incrementados, exudación de fluidos, incluidas proteínas del plasma, y migración de leucocitos al foco inflamatorio.

Además, el término comprende la inflamación provocada por lesión física o química externa o por agentes biológicos, p. ej. virus, bacterias, hongos, infecciones por parásitos protozoos o metazoos, así como inflamación que es supuestamente no provocada, p. ej. que se produce en ausencia de una lesión o infección demostrables, respuestas de la inflamación a auto-antígenos (inflamación auto-inmune), respuestas de la inflamación a células, tejidos u órganos xenogénicos o alogeneicos injertados, respuestas de la inflamación a alérgenos, etc. El término cubre tanto inflamación aguda como inflamación crónica. También, el término incluye tanto la inflamación local o localizada, así como la inflamación sistémica, es decir, aquella en que uno o más procesos inflamatorios no están confinados a un tejido particular, sino que se producen generalmente en el endotelio y/u otros sistemas de órganos.

El término “inflamación”, tal como se utiliza en esta memoria, comprende particularmente patologías que comprenden un componente inflamatorio e incluye, *entre otros*, estados, afecciones o enfermedades inflamatorios, locales y sistémicos, así como agudos o crónicos. Preferiblemente, pero sin limitación, el término puede referirse a cualquiera de las siguientes afecciones:

- caquexia, p. ej. caquexia asociada con cáncer o enfermedades infecciosas tales como, p. ej., SIDA;
- sepsis gram-negativa, choque inducido por endotoxinas, síndrome del choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS – siglas en inglés) o síndrome de disfunción de múltiples órganos (MODS – siglas en inglés);
- vacunación;

- patologías de injerto frente a hospedante tales como, p. ej., la enfermedad del injerto frente al hospedante (GVHD – siglas en inglés) o rechazo de tejidos u órganos xenogénicos o alogeneicos trasplantados tales como, p. ej., rechazo de la médula ósea alogeneica o trasplantes de la sangre del cordón umbilical;
- procesos infecciosos y parasíticos agudos y crónicos tales como infecciones virales, bacterianas o fúngicas, y parásitos protozoos o metazoos, que incluyen, preferiblemente, malaria cerebral o meningitis meningocócica;
- trastornos alérgicos tales como, p. ej., rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, asma, eczema, urticaria, dermatitis por contacto, respuesta alérgica sistémica (anafilaxis) o choque anafiláctico, más preferiblemente elegidos de rinitis alérgica y asma;
- trastornos inflamatorios crónicos (que comprenden generalmente un grupo heterogéneo de afecciones que implican típicamente actividad local o sistémica, crónica o recurrente, de uno o más procesos y/o componentes inflamatorios de inmunidad innata o adaptativa en ausencia de causa demostrable, p. ej. infección o lesión del tejido) y/o enfermedades auto-inmunes (que implican generalmente una respuesta inmune contra un componente de auto-tejido o tejido (es decir, un auto-antígeno, incluida una respuesta de auto-anticuerpo o respuesta mediada por células, y que incluyen también condiciones auto-inmunes específicas para órganos y no específicas para órganos. Preferiblemente, dicha afección puede elegirse de encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM – siglas en inglés); enfermedad de Addison; enfermedad de Alzheimer (AD – siglas en inglés), espondilitis anquilosante; síndrome del anticuerpo antifosfolípido (APS – siglas en inglés); anemia aplásica; aterosclerosis; gastritis auto-inmune; hepatitis auto-inmune; trombocitopenia auto-inmune; enfermedad de Behcet; enfermedad celiaca; dermatomiositis; diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II; fiebre mediterránea familiar; síndrome auto-inflamatorio familiar inducido por el frío; síndrome de Goodpasture; gota; pseudo-gota; enfermedad de Graves; síndrome de Guillain-Barré (GBS – siglas en inglés); enfermedad de Hashimoto; fiebres periódicas hereditarias; púrpura trombocitopénica idiopática; enfermedad del intestino inflamatorio (IBD – siglas en inglés) que incluye la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; lesión por isquemia-reperusión; enfermedad de Kawasaki; enfermedad de tejido conjuntivo mixta, síndrome de Muckle-Wells; esclerosis múltiple (MS – siglas en inglés); miastenia grave; síndrome de opsoclonus-mioclonus (OMS – siglas en inglés); neuritis óptica; tiroiditis de Ord; osteoartritis; enfermedad de Parkinson (PD – siglas en inglés), pénfigo; anemia perniciosa; poliarteritis nodosa, polimiositis; inflamación postoperatoria o traumática; cirrosis biliar primaria; mioxedema primario; psoriasis; artritis psoriática; fiebre reumática; artritis reumatoide; síndrome de Reiter; escleroderma; síndrome de Sjögren; apoplejía-isquemia; lupus eritematoso sistémico (SLE – siglas en inglés); artritis idiopática juvenil de brote sistémico; arteritis de Takayasu; arteritis temporal; vitiligo; anemia hemolítica auto-inmune mediada por anticuerpos calientes y granulomatosis de Wegener.

La inflamación y enfermedades y afecciones inflamatorias tales como, p. ej., las listadas anteriormente, pueden constituir o dar origen a estímulos inflamatorios que pueden – con una susceptibilidad diferente – conducir a la aterogénesis en pacientes.

Más preferiblemente, la presente invención se refiere a métodos de diagnóstico, particularmente útiles en afecciones caracterizadas por un estado alterado del glicocalix tal como una alteración de la anchura del glicocalix y/o de la reserva del volumen capilar. Más preferiblemente, las afecciones se eligen, pero no se limitan a cáncer, diabetes tal como diabetes mellitus tipo I o diabetes mellitus tipo II, insuficiencia renal, arterosclerosis prematura, sepsis, hipertensión, hipertensión maligna, pre-eclampsia.

Glicocalix

Tal como se utiliza en esta memoria, “glicocalix” se refiere generalmente a una matriz extracelular rica en polisacáridos sobre la superficie luminal de células endoteliales vasculares. El glicocalix está principalmente constituido por proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas (p. ej. selectinas, moléculas de adhesión, etc.) que se asocian *in vivo* con agua y numerosas moléculas que incluyen, *entre otros*, proteínas del plasma, lípidos y enzimas procedentes de la sangre circulante.

El “estado del glicocalix” se refiere a la condición del glicocalix en un instante particular, incluida la posición relativa. El estado del glicocalix se puede caracterizar por parámetros del glicocalix. El término “alteración”, con referencia a parámetros del glicocalix (p. ej. volumen o dimensión, anchura, permeabilidad, actividad enzimática, etc.), comprende generalmente cualquier dirección (p. ej. aumento o disminución) y extensión de una alteración de este tipo. Por ejemplo, una “disminución” en un valor de un parámetro puede incluir disminuciones en al menos aproximadamente 10%, o en al menos aproximadamente 20%, o en al menos aproximadamente 30%, o en al menos

aproximadamente 40%, o en al menos aproximadamente 50%, o en al menos aproximadamente 60%, o en al menos aproximadamente 70%, o en al menos aproximadamente 80%, o en al menos aproximadamente 90%, en comparación con un valor de referencia relevante tal como, por ejemplo, el valor de dicho parámetro en un sujeto testigo (sano). Por ejemplo, un “aumento” en un valor de un parámetro puede incluir aumentos en al menos aproximadamente 10%, o en al menos aproximadamente 20%, o en al menos aproximadamente 40%, o en al menos aproximadamente 60%, o en al menos aproximadamente 80%, o en al menos aproximadamente 100%, o en al menos aproximadamente 150% o 200% o, incluso, en al menos aproximadamente 500% o similar, en comparación con un valor de referencia relevante tal como, por ejemplo, el valor de dicho parámetro en un sujeto testigo (sano). Se apreciará que la alteración de los parámetros del glicocalix resulta en una alteración del estado del glicocalix.

Más típicamente, una afección que implica la degeneración del glicocalix se puede caracterizar por un volumen o dimensión reducido del glicocalix, una permeabilidad incrementada del glicocalix, una diseminación incrementada del glicocalix (es decir, que resulta en un grosor reducido de la capa del glicocalix), actividad incrementada de enzima o enzimas degradantes del glicocalix y/o actividad disminuida de enzima o enzimas que sintetizan el glicocalix. De manera deseable, una intervención de tratamiento tal como, por ejemplo, se ha descrito en esta memoria, invertiría estas tendencias.

La expresión “enzima para el metabolismo del glicocalix” comprende generalmente enzimas que participan en el anabolismo (es decir, formación) o catabolismo (es decir, degradación) del glicocalix o de uno o más de sus componentes. Preferiblemente, pero sin limitación, el término incluye hialuronidasa, mieloperoxidasa, heparinasa y otras exo- y endo-glicosidasas.

Tal como se ha señalado, las características anteriores del glicocalix endotelial pueden determinarse ventajosamente por medio de la detección de uno o más marcadores relacionados con el glicocalix en una muestra tomada de un sujeto. En particular, marcadores de este tipo pueden incluir moléculas derivadas del glicocalix, enzimas del metabolismo del glicocalix y/o sustancias endógenas o exógenas que normalmente se asocian con el glicocalix.

Moléculas derivadas del glicocalix, particularmente adecuadas para la detección, incluyen, sin limitación, hialuronano, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, sindecán-1 y contenido total de glicosaminoglicano en el plasma (GAG – siglas en inglés). Habitualmente, moléculas de este tipo se pueden liberar en el torrente sanguíneo debido a una degradación o diseminación persistente del glicocalix y, así, pueden indicar alteraciones degenerativas del glicocalix.

Enzimas del metabolismo del glicocalix, particularmente adecuadas para la detección, incluyen, sin limitación, hialuronidasa, mieloperoxidasa, heparinasa y otras exo- y endo-glicosidasas. Por ejemplo, niveles circulantes incrementados o disminuidos de enzimas de este tipo pueden indicar reacciones enzimáticas en curso catalizadas por ellas, permitiendo confirmar la homeostasis del glicocalix.

Sustancias que se asocian con el glicocalix, endógenas y exógenas, particularmente adecuadas para la detección, incluyen, sin limitación, moléculas trazadoras que traspasan el glicocalix tales como, *entre otras*, dextrano 40, o proteínas similares lectina endógenas que normalmente se asocian con el glicocalix. Por ejemplo, la cantidad circulante de sustancias de este tipo, opcionalmente después de su inyección o infusión, proporcionan una representación de la capacidad del glicocalix a agotar dichas sustancias del torrente sanguíneo y, con ello, es una estimación del volumen o dimensión del glicocalix y de la accesibilidad molecular.

Biosensor

El término “biosensor”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere generalmente a un dispositivo o aparato que utiliza uno o más materiales biológicamente sensibles inmovilizados (tales como, por ejemplo, un receptor, un anticuerpo, una enzima, un sustrato, una organela o una célula entera) para detectar y/o cuantificar uno o más analitos de interés deseados en una muestra analizada. Una reacción de unión o química entre el material biológicamente sensible inmovilizado y dicho analito deseado se traduce en una señal física, química o fisico-química detectable.

En una realización preferida, dicho material biológicamente sensible inmovilizado puede ser un receptor tal como, sin limitación, un péptido, polipéptido, una proteína, un anticuerpo, un aptámero o un péptidomimético, capaz de unirse específicamente con una molécula derivada del glicocalix, una enzima para el metabolismo del glicocalix o una sustancia asociada con el glicocalix endógena o exógena, según se definen en esta memoria. Una unión de este tipo puede exhibir preferiblemente una elevada afinidad, es decir, puede tener una constante de afinidad (K_A) de $K_A \geq 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, más preferiblemente, $K_A \geq 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, tal como, p. ej., $K_A \geq 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, todavía más preferiblemente $K_A \geq 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, incluso más preferiblemente $K_A > 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, p. ej. $K_A \geq 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $K_A \geq 1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ o $K_A \geq 1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, o incluso mayor, en donde $K_A = [R_A]/[R][A]$, R designa al receptor y A designa al analito deseado.

Dicho material biológicamente sensible inmovilizado puede ser un sustrato capaz de ser accionado y alterado químicamente por una enzima del metabolismo del glicocalix cuya detección se pretende.

- 5 Dicho material biológicamente sensible e inmovilizado puede ser una enzima capaz de actuar por o alterar químicamente una molécula derivada del glicocalix o una sustancia asociada con el glicocalix endógena o exógena según se define en esta memoria.

10 La presente invención contempla cualquier modo adecuado de transducir la unión o reacción entre el material biológicamente sensible inmovilizado y el analito deseado en una señal detectable y en la detección de dicha señal.

15 En particular, la señal generada y el correspondiente elemento detector del presente dispositivo biosensor puede emplear, sin limitación, modos de detección físico-químicos, ópticos (p. ej., utilizando la resonancia de plasmón de superficie, o basados en cambios de absorbancia o fluorescencia), piezoeléctricos, electroquímicos (p. ej. para detectar reacciones redox utilizando electrodos), termométricos o magnéticos. El diseño general y uso de biosensores es conocido en la técnica y se puede aplicar para los usos de la presente invención (véase, p. ej., Biosensors: A Practical Approach, 2ª ed., Cooper J y Cass T, comps., Oxford University Press 2003, ISBN 0199638462; y Biosensors: Theory and Applications, DG Buerk, Technomic Publishing Company 1993, ISBN 0877629757), incorporados específicamente en esta memoria como referencia.

20 Los términos “tratar” o “tratamiento” comprenden tanto el tratamiento terapéutico de un trastorno ya desarrollado, tal como la terapia de una enfermedad vascular o inflamatoria ya desarrollada, como medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo consiste en prevenir o reducir las posibilidades de incidencia de una afección indeseada tal como para prevenir las posibilidades de contracción y progreso de una enfermedad vascular o inflamatoria. Resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, sin limitación, el alivio de uno o más síntomas o de uno o más marcadores biológicos (p. ej. de citoquinas inflamatorias, fiebre, ateromas, etc.), disminución del grado de la enfermedad estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la enfermedad, demora o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y similares. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibiera tratamiento.

25 La expresión “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto o agente farmacéutico activo que inhibe o demora en un sujeto el brote de un trastorno tal como es buscado por un investigador, veterinario, doctor médico u otro doctor. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que induce la respuesta biológica o médica en un sujeto que está siendo investigado por un investigador, veterinario, doctor médico u otro médico, que puede incluir, *entre otros*, el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que esté siendo tratado. Se conocen métodos en la técnica para determinar dosis terapéutica y profilácticamente eficaces.

40 Constituyentes del glicocalix útiles para la reparación profiláctica y/o terapéutica del glicocalix en los estados patológicos arriba definidos incluyen preferiblemente, pero sin limitación, glicosaminoglicanos; heparina que incluye, *entre otras*, heparina fraccionada; glicomiméticos; sustratos o compuestos intermedios de la vía de síntesis de hialuronano; y xilosidas (que ceban la síntesis de GAG).

45 Enzimas para el catabolismo del glicocalix útiles como dianas para la inhibición en el tratamiento de los estados patológicos arriba definidos incluyen, preferiblemente pero sin limitación, hialuronidasa, mieloperoxidasa, heparinasa y otras exo- y endo-glicosidasas.

50 El término “inhibición” comprende cualquier grado de inhibición de una enzima para el catabolismo del glicocalix, en particular de su actividad enzimática degradante del glicocalix tal como, p. ej., la inhibición en al menos aproximadamente el 10%, en al menos aproximadamente el 20%, en al menos aproximadamente el 30%, en al menos aproximadamente el 40%, en al menos aproximadamente el 50%, en al menos aproximadamente el 60%, en al menos aproximadamente el 70%, en al menos aproximadamente el 80%, en al menos aproximadamente el 90% o incluso en aproximadamente el 100%, comparado con la actividad de dicha enzima en ausencia del inhibidor. El grado de dicha inhibición se puede medir mediante ensayos conocidos en la técnica.

55 El término “inhibidor” se refiere generalmente a una sustancia o molécula capaz de conseguir la inhibición de una diana deseada tal como de una enzima para el catabolismo del glicocalix.

60 Las expresiones “compuesto orgánico” o “molécula orgánica”, tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a su connotación amplia en la técnica. Las expresiones comprenden moléculas orgánicas que son productos naturales, así como que se sintetizan en parte o por completo.

La expresión “molécula orgánica pequeña”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a compuestos orgánicos con un tamaño equiparable a las moléculas orgánicas generalmente utilizadas en productos farmacéuticos. La expresión excluye macromoléculas biológicas (p. ej. proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscilan en un tamaño de hasta aproximadamente 5000 Da, p. ej. hasta aproximadamente 4000, preferiblemente hasta 3000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, incluso más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da, p. ej. hasta aproximadamente 900, 800, 700, 600 o hasta aproximadamente 500 Da.

El término “anticuerpo” se utiliza en esta memoria en su sentido más amplio y, generalmente, se refiere a cualquier agente de unión inmunológico. El término comprende específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes (p. ej. bivalente, trivalente o de mayor valencia) y/o anticuerpos multi-específicos (p. ej. anticuerpos biespecíficos o de mayor especificidad) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos (que incluyen, p. ej., los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena sencilla) en la medida en que exhiban la actividad biológica deseada (particularmente, la capacidad de unirse específicamente a un antígeno de interés) así como materiales compuestos multivalentes y/o multiespecíficos de este tipo de fragmentos (p. ej., dicuerpos, tricuerpos y multicuerpos). El término “anticuerpo” no solo incluye anticuerpos generados por métodos que comprenden la inmunización, sino también incluye cualquier polipéptido, p. ej. un polipéptido expresado de forma recombinante, que se hace que abarque al menos una región determinante de la complementariedad (CDR – siglas en inglés) capaz de unirse específicamente a un epítipo en un antígeno de interés. Por lo tanto, el término se aplica a este tipo de moléculas, independientemente de que se produzcan *in vitro* o *in vivo*.

El término “aptámero”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un oligo-ADN, oligo-ARN u oligo-ADN/ARN de cadena sencilla o de cadena doble o cualquier análogo de los mismos que se puede unir específicamente a una molécula diana tal como una proteína o péptido, más típicamente a un péptido. Ventajosamente, los aptámeros pueden exhibir una especificidad y afinidad bastante elevada (p. ej., K_A en el orden de $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) para sus dianas. La producción de aptámeros se describe, entre otros, en el documento US 5.270.163; Ellington & Szostak 1990 (Nature 346: 818-822); Tuerk & Gold 1990 (Science 249: 505-510); o “The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications” por Klussmann, comp., Wiley- VCH 2006, ISBN 3527310592, incorporado específicamente como referencia en esta memoria.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “peptidomimético” se refiere a un agente no peptídico que es un análogo topológico de un péptido correspondiente. Métodos de diseñar racionalmente peptidomiméticos de péptidos se conocen en la técnica. Por ejemplo, el diseño racional de tres peptidomiméticos basados en el péptido 8-mero sulfatado CCK26-33, y de dos peptidomiméticos basados en el péptido 11-mero Sustancia P, y principios de diseño peptidomiméticos relacionados, se describen en Horwell 1995 (Trends Biotechnol 13: 132-134), incorporado específicamente como referencia en esta memoria.

Método de distribución por tamaños

En una realización adicional de la presente invención, los autores de la misma han determinado un método *ex vivo* para evaluar el estado del glicocalix. El estado del glicocalix se puede evaluar utilizando un método de distribución por tamaños en el que se determina la dimensión del glicocalix endotelial de vasos sanguíneos capilares individuales o la anchura del glicocalix (GW). Adicionalmente, el método de distribución por tamaños también puede proporcionar mediciones para la anchura de los glóbulos rojos (RBCW – siglas en inglés) en los vasos sanguíneos, el diámetro de los vasos (VD – siglas en inglés) y la reserva del volumen capilar (CVR – siglas en inglés).

Tal como se utiliza en esta memoria, “anchura de los glóbulos rojos (RBCW)” se define como el valor medio de múltiples mediciones de la anchura de glóbulos rojos en un segmento microvascular de un vaso sanguíneo. Dado que el segmento microvascular se caracteriza por facilitar únicamente la perfusión de una línea individual de glóbulos rojos (tal como se muestra en la Figura 4), se pueden realizar mediciones de la anchura de los glóbulos rojos individuales.

Tal como se utiliza en esta memoria, el “diámetro de los vasos (VD)” se define como el diámetro del segmento microvascular del vaso sanguíneo perfundido por una línea individual de glóbulos rojos. Los autores de la invención han encontrado, sorprendentemente, que durante las mediciones de la RBCW, un pequeño porcentaje de los glóbulos rojos se extiende en el dominio del glicocalix sobre la membrana endotelial luminal de la que los glóbulos rojos quedan excluidos la mayor parte del tiempo. Por lo tanto, las mediciones de la RBCW proporcionan también un número de valores de medición que se extienden en el dominio del glicocalix y, por lo tanto, proporcionan valores para el diámetro del vaso. Se ha demostrado que las mediciones del valor máximo de múltiples mediciones de la anchura de los glóbulos rojos (RBCW) en un segmento microvascular proporciona una medición precisa del diámetro de los vasos (VD).

Tal como se utiliza en esta memoria, la “anchura del glicocalix (GW)” es la dimensión del hueco entre la anchura de los glóbulos rojos y el diámetro de los vasos. Dado que la anchura del glicocalix (GW) se refiere a la dimensión del glicocalix endotelial de glóbulos rojos capilares individuales, es indicativa del estado del glicocalix.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, la “reserva del volumen capilar (CVR)” se define como la relación de la segunda potencia de RBCWmax frente a la segunda potencia de la RBCW. La CVR se puede definir de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$CVR = \frac{RBCW_{max}^2}{RBCW^2},$$

con RBCWmax igual a VD, para VD igual a o mayor que la anchura máxima del RBC individual.

10 En todos los otros casos, la RBCWmax es igual a la anchura máxima del RBC individual.

Mediciones de la distribución por tamaños se pueden realizar en imágenes obtenidas con microscopios clínicos. En una primera instancia, se visualiza un vaso sanguíneo y se capturan imágenes secuenciales de los glóbulos rojos que perfunden el vaso sanguíneo. Para cada una de las imágenes se mide la RBCW de los glóbulos rojos visualizados y se obtiene una distribución por tamaños. El método de medición mide al menos 10, preferiblemente más de 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 o más valores de la RBCW para un vaso sanguíneo dado. La medición de estos valores ha revelado que un pequeño porcentaje de los glóbulos rojos se extiende en el dominio del glicocalix en la membrana endotelial luminal de la que están excluidos los glóbulos rojos la mayor parte del tiempo. Por lo tanto, la medición de la distribución por tamaños proporciona una distribución estadística, en donde la mayoría de las mediciones proporcionan el valor real de la RBCW en el vaso sanguíneo, mientras que sólo un pequeño porcentaje de las mediciones proporciona una medición del diámetro real del vaso. Por lo tanto, el valor p50 procedente de la o las mediciones de la distribución por tamaños proporciona el valor real medio de la RBCW en el vaso sanguíneo, mientras que el valor p99 proporciona el valor máximo de la RBCW correspondiente al valor del diámetro del vaso sanguíneo. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “valor p50” indica que existe una probabilidad del 50% de que el valor real pueda estar por debajo del valor presentado, y que existe una probabilidad del 50% de que el valor real pueda ser mayor que el valor presentado. Por lo tanto, el “valor p50” se refiere al valor medio de la RBCW o corresponde al valor mediano de la RBCW. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión, “valor p99” indica que existe una probabilidad del 99% de que el valor real pueda estar por debajo del valor presentado, y que existe una probabilidad del 1% de que el valor real pueda ser mayor que el valor presentado. Por lo tanto, el “valor p99” corresponde al valor máximo de la RBCW y, por consiguiente, al diámetro del vaso. Tal como se utiliza en esta memoria, el valor “promedio” se refiere al valor medio, mediano o modo de los valores según se miden. El valor medio, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la media aritmética de un conjunto de datos. El valor mediano, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al número que separa la mitad más alta de un conjunto de datos de la mitad más baja. El valor modo, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al valor que se produce de la manera más frecuente en un conjunto de datos.

A partir de las mediciones del valor real de la RBCW y del diámetro de los vasos, se puede determinar la anchura del glicocalix (GW), dado que la anchura del glicocalix es igual a [el diámetro del vaso menos el valor real de la RBCW] dividido por 2. Al determinar la anchura del glicocalix, el método de distribución por tamaños proporciona el estado del glicocalix.

El estado del glicocalix se puede evaluar adicionalmente determinando el valor de CVR de acuerdo con la fórmula dada. Dado que el valor de CVR proporciona tanto información respecto al diámetro del vaso como a la anchura del glicocalix, este valor se puede utilizar también para evaluar el estado del glicocalix. En los casos en los que la anchura del glicocalix se mantiene inalterada, pero se reduce o aumenta el diámetro del vaso, el valor de CVR, al contrario del valor de la anchura del glicocalix, proporcionará una información incluso más precisa respecto al estado del glicocalix.

Lo ventajoso de este enfoque es que la presente invención proporciona una estrategia para determinar el estado del glicocalix sin la necesidad de identificar la posición exacta de la superficie luminal de la pared vascular. Tampoco se requiere utilizar la ampliación transitoria inducida por leucocitos de anchuras de los RBC (véase la Figura 4).

El método de medición de la presente invención permite, por lo tanto, una confirmación automatizada y no invasiva de la anchura microvascular de glóbulos rojos, el diámetro de los vasos, la anchura del glicocalix y la reserva del volumen capilar en todos los microvasos perfundidos por RBC representados en imágenes en registros microscópicos clínicos así como experimentales intravitales.

La expresión “no invasivo”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un proceso que no penetra mecánicamente ni rompe la piel. Por lo tanto, el proceso no requiere una incisión en el cuerpo ni la separación de

tejido biológico.

Adicionalmente, los autores de la invención han encontrado que sólo se requieren unos pocos segundos de perfusión de glóbulos rojos en un microvaso dado para permitir el análisis de la anchura de los glóbulos rojos, el diámetro de los vasos, la anchura del glicocalix y la reserva del volumen capilar. Además de ello, todos los microvasos en un campo de visión dado se pueden analizar simultáneamente y, por lo tanto, el registro de un solo campo de visión dura unos segundos, y el registro de múltiples campos de visión se puede lograr en cuestión de uno o varios minutos. El método de medición de la presente invención proporciona, por lo tanto, distribuciones precisas de la anchura de los glóbulos rojos, el diámetro de los vasos, la anchura del glicocalix y la reserva del volumen capilar de más de 100 vasos sanguíneos en un corto período de tiempo.

Más preferiblemente, microvaso se refiere a un vaso sanguíneo con un pequeño diámetro y, preferiblemente un diámetro menor que 100 µm, mas preferiblemente menor que 50 µm, más preferiblemente menor que 25 µm, 20 µm, 19 µm, 18 µm, 17 µm, 16 µm, 15 µm, 14 µm, 13 µm, 12 µm, 11 µm, 10 µm, 9 µm, 8 µm, 7 µm y, más preferiblemente, menor que o igual a aproximadamente 10 µm.

En una realización preferida, la presente invención se refiere, además, a un método para evaluar el estado del glicocalix de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización más preferida, la presente invención se refiere a un método de acuerdo con la reivindicación 2.

De acuerdo con el método de la presente invención, la anchura del glicocalix se puede definir como el (diámetro del vaso (VD) menos la anchura del glóbulo rojo (RBCW)) dividido por 2.

La reserva del volumen capilar se puede definir como la relación del volumen de la sangre vascular máximo cuando el volumen del glicocalix es accesible a los glóbulos rojos, determinado de acuerdo con la siguiente fórmula

$$CVR = \frac{RBCW_{max}^2}{RBCW^2},$$

con RBCWmax igual a VD para VD igual o mayor que la anchura máxima del RBC individual.

En todos los otros casos, RBCWmax es igual a la anchura máxima del RBC individual.

Los autores de la invención han encontrado que las mediciones se pueden realizar en cuestión de minutos, y el método de la presente invención permite, por lo tanto, la detección de cambios dinámicos en la anchura de los glóbulos rojos, el diámetro de los vasos, la anchura del glicocalix y la reserva del volumen capilar en respuesta a un estímulo controlado.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para identificar compuestos, factores de riesgo cardiovasculares o factores de estilo de vida que modulan el estado del glicocalix, de acuerdo con la reivindicación 3. Las expresiones factor de riesgo cardiovascular y factor de estilo de vida se refieren a uno o más factores de riesgo elegidos de la edad, fumar, hiperglucemia y dislipidemia; y/o en sujetos que tienen una o más patologías de riesgo elegidas de lesión por isquemia-reperfusión, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, hiperglucemia, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, dislipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, cáncer, enfermedad infecciosa y trauma.

También se describe en esta memoria un método para diagnosticar el cáncer o la diabetes o la susceptibilidad al cáncer o a la diabetes en un sujeto, que comprende detectar en dicho sujeto una alteración en el estado del glicocalix. A modo de ejemplo y no de limitación, las alteraciones en el estado del glicocalix en sujetos a los que se les ha diagnosticado cáncer o diabetes se puede comparar con un sujeto o sujetos testigos a los que no se les ha diagnosticado cáncer ni diabetes o que no son susceptibles a cáncer ni diabetes, para evaluar si se produce una diferencia significativa que pueda ser indicativa del fenotipo patológico.

Se apreciará que los métodos de diagnóstico anteriores se pueden utilizar en combinación o en sincronía, particularmente para un tratamiento a medida ventajoso a pacientes individuales. Por ejemplo, en los casos en los que un ensayo diagnóstico como el anterior determina que el estado del glicocalix está significativamente alterado en un paciente, el tratamiento en dicho paciente se puede lograr subsiguientemente restaurando el estado del glicocalix.

También, los presentes métodos de diagnóstico se pueden utilizar para vigilar, incluso en pacientes individuales, la eficacia de cualesquiera intervenciones terapéuticas en la restauración del estado del glicocalix (p. ej. de tratamiento según se describe en esta memoria; u otros tratamientos tales como, *entre otros*, medicación para mejorar la sensibilidad a insulina en pacientes diabéticos, terapia con heparina en pacientes de cáncer, tratamientos existentes diseñados para mejorar la función endotelial en enfermedades inflamatorias, etc.) con respecto al estado del glicocalix.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un programa de ordenador almacenado en un medio susceptible de ser leído por el ordenador o un dispositivo de ordenador autónomo similar, configurado para:

- 5 (a) leer los datos de distribución de la RBCW; y
 (b) determinar el estado del glicocalix de acuerdo con el método de la presente invención.

Los aspectos y realizaciones anteriores quedan sustentados adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

10 EJEMPLOS

EJEMPLO 1

15 El presente ejemplo demuestra que reacciones inflamatorias inducidas por endotoxinas conducen a una disminución del volumen o dimensión del glicocalix en seres humanos y que el factor de necrosis tumoral α (TNF α) juega un papel en este proceso. En particular, voluntarios varones sanos recibieron por vía intravenosa una dosis baja de endotoxina, con (n = 8) o sin (n = 13) tratamiento previo con el receptor de TNF α soluble Etanercept. El glicocalix sistémico y microvascular se estimaron en los valores de referencia y 4 horas después de la estimulación con endotoxina:

20

Materiales y métodos

Diseño del estudio

25 Se estudiaron veintiún voluntarios varones caucasianos sanos. El estudio fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional del Centro Médico Académico, Amsterdam y de todos los voluntarios se obtuvo un consentimiento informado por escrito. Los participantes no tenían historial alguno de enfermedad cardiovascular. Los sujetos no fumaban, no hacían uso de medicación alguna y estaban exentos de cualquier enfermedad febril el mes que precedía al estudio. El historial médico, el examen físico, el examen de laboratorio rutinario, el electrocardiograma y los rayos X del pecho eran normales y equiparables. Todos los experimentos se realizaron después de ayuno durante una noche. En todos los sujetos se realizó una medición de los valores de referencia que comprendía el volumen sistémico del glicocalix, el grosor del glicocalix microvascular y la bioquímica. Cinco días más tarde, a los sujetos se les administró una inyección intramuscular de solución salina (n = 13) o Etanercept (n = 8; Enbrel® 50 mg, Wyeth Pharmaceuticals, Madison, NJ, EE.UU.). Al cabo de 48 horas, todos los sujetos recibieron una inyección de bolo de endotoxina por vía intravenosa (1 ng/kg de peso corporal), United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, MD, EE.UU.). La incidencia, tiempo y gravedad de los síntomas clínicos asociados con endotoxemia se registraron como se publicó previamente (Suffredini *et al.* 1999, J Infect Dis 172: 1278-82). Después de la infusión de endotoxina, se midieron a intervalos regulares los signos vitales que incluían la presión arterial, el ritmo cardiaco y la temperatura corporal. El volumen sistémico del glicocalix y el grosor microvascular del glicocalix se midieron aproximadamente 4 horas después de la infusión de endotoxina, pero en el mismo momento del día que la medición de los valores de referencia.

40

Estimación del volumen sistémico del glicocalix

45 El volumen sistémico del glicocalix se estimó según se publicó previamente, sustrayendo el volumen circulante de plasma del volumen intravascular de distribución del trazador permeable al glicocalix Dextran 40 (Nieuwdorp M *et al.* 2006. Diabetes 55: 480-6; Suffredini *et al.* 1999, *supra*). El volumen circulante del plasma se calculó con un método previamente publicado (Orth *et al.* 1998. Anesth Analg 87: 1234-8). El volumen de distribución intravascular de eritrocitos autólogos marcados se utilizó para cuantificar el volumen de sangre circulante. La sangre se extrajo y centrifugó a 1.330 rpm durante 5 minutos. Subsiguientemente, a la fracción de eritrocitos se añadió durante 5 minutos fluoresceína sódica (fluoresceína-di-Na al 25%, 250 mg/ml, AZUA Pharmacy, Amsterdam, Holanda). Después de un lavado cuidadoso, los eritrocitos marcados se resuspendieron en solución salina al volumen inicial (60 ml) y se re-infundieron. Subsiguientemente, se extrajo sangre a los 4, 5, 6 y 7 minutos después de la infusión. La fracción de eritrocitos marcados en la agrupación total de eritrocitos se utilizó para estimar el volumen circulante de eritrocitos (V_{ERI}). Como testigo negativo servían eritrocitos no marcados pre-inyección. La fracción de eritrocitos marcados en la sangre se midió utilizando un analizador FACScan (FACS Calibur®, Becton Dickinson, Mountain View, EE.UU.). Se hizo un recuento de al menos 100.000 células. Los datos se analizaron mediante el aparato Cellquest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU.). El hematocrito (Ht) se midió después de la centrifugación de sangre heparinizada en una centrífuga de Hettich-Haemotokrit a 10.000 rpm durante 5 minutos (Hettich, Tuttlingen, Alemania). El volumen del plasma circulante se calculó a partir de V_{ERI} y Ht de vasos grandes mediante la siguiente fórmula: volumen de plasma circulante = $([1 - Ht] \times V_{ERI})/Ht$.

60

Dextran 40 (Rheomacrodex; NPBI International, Emmercompascuum, Holanda) se utilizó como una sonda para estimar el volumen total intravascular que incluye, el compartimiento del glicocalix. Un bolo de 10 ml de Dextran 1 (Promiten; NPBI International, Emmercompascuum, Holanda) se inyectó para atenuar el riesgo de reacciones anafilácticas antes de la infusión de Dextran 40. 100 ml de Dextran 40 se inyectaron por vía intravenosa, seguido de un muestreo repetido de sangre a los 5, 7, 10, 15, 20 y 30 minutos. La concentración de Dextran 40 se calculó midiendo el incremento en la concentración de glucosa en las muestras post-infusión después de hidrólisis de polímeros de glucosa con Dextran 40 (Van Kreel *et al.* 1998, Clin Chim Acta 275: 71-80). La concentración de glucosa por unidad de tiempo se evaluó por duplicado utilizando el método de la hexoquinasa (Gluco-quant, Hitachi 917; Hitachi). Para determinar el volumen de distribución intravascular inicial de Dextran 40, la concentración de Dextran 40 se estimó en el momento de la inyección mediante el ajuste exponencial de las concentraciones de Dextran 40 medidas. Las constantes del tiempo exponencial (τ [min]) se utilizaron para determinar las tasas de aclaramiento sistémico de Dextran 40 ($\tau^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Estimación del glicocalix microvascular

El grosor del glicocalix endotelial en vasos sanguíneos capilares individuales se midió mediante imágenes espectrales de polarización ortogonal (OPS) de la microcirculación sublingual (Cytometrics, Philadelphia, PA, EE.UU.) tal como se publicó previamente (Nieuwdorp *et al.* 2006, *supra*; Nieuwdorp *et al.* 2006. Diabetes 55: 1127-32). En síntesis, la anchura de los eritrocitos fluyentes se midió en 5 capilares individuales antes e inmediatamente después del paso de los leucocitos capilares. En capilares sanos, el glicocalix limita el llenado con sangre capilar, separando eritrocitos de la superficie endotelial luminal, que es conocida como la zona de exclusión de los glóbulos rojos. Bajo condiciones de estado estacionario, esta zona de exclusión de los glóbulos rojos representa un límite superior al grosor máximo posible del glicocalix endotelial. Dado que los leucocitos comprimen transitoriamente el glicocalix endotelial capilar, se puede utilizar el correspondiente ensanchamiento transitorio de la columna de eritrocitos capilar para estimar la dimensión capilar del glicocalix. (Han *et al.* 2006. Journal of Fluid Mechanics 554: 217-35). Se registraron imágenes de un tamaño de 728 x 576 píxeles, se recogieron con un objetivo de 5x, proporcionando un aumento de 325x a una velocidad del marco de 25/segundo. El análisis de las imágenes se realizó con el aparato Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.) por parte de un único observador, quien desconocía los detalles clínicos de los participantes. El diámetro capilar anatómico y la anchura de la columna de eritrocitos fluyentes se midieron utilizando calibres digitales antes de y después del paso espontáneo de los leucocitos capilares. Por cada participante, la dimensión del glicocalix se determinó en al menos 5 capilares. Se calculó la media de estos resultados y se utilizó en análisis adicionales. Además, como indicación de la densidad capilar, se hizo un recuento del número de capilares por campo.

Muestreo de sangre y métodos de laboratorio

Se tomaron muestras de sangre de los sujetos en la medición de los valores de referencia, así como en los instantes $t = 0$, y $\frac{1}{2}$, 1, 3, 4 y 24 horas después de la infusión de endotoxina. Después de la centrifugación, partes alícuotas se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Las concentraciones en plasma de leucocitos así como subfracciones se determinaron en plasma con EDTA con análisis citométrico de flujo estandarizado. Los niveles de CRP en el plasma se midieron con un ensayo comercialmente disponible (Roche, Suiza). Los niveles del receptor del TNF α tipo 2 soluble en plasma (sTNFR2) se midieron utilizando un análisis con enzima unida a inmunosorbente (ELISA) (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, EE.UU.) como un marcador de la administración eficaz de Etanercept. Los niveles de IL-6 en plasma, una citoquina inducida por la actividad de TNF α , se midieron utilizando una técnica de la Disposición de Perlas Citométrica (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). El fragmento de activación de protrombina F1 + 2 (Dade Behring, Marburg, Alemania), se midió mediante ELISA para estimar la generación de trombina. Los niveles de dímeros D se midieron como una reflexión de la formación de fibrina y la subsiguiente fibrinólisis endógena con un inmunoensayo de partículas de látex cuantitativo automatizado (Biomerieux, Durham, NC, EE.UU.). El hialuronano en plasma cuantitativo se midió mediante ELISA (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, EE.UU.) que mide la cantidad total (incluido el peso molecular bajo y alto) de hialuronano. El sulfato de heparano se midió después de tratamiento previo con suero con Actinase E (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) mediante ELISA (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japón). La actividad total de hialuronidasa en plasma se determinó con un ensayo previamente publicado con pequeñas modificaciones (24). En síntesis, placas CovaLink (Nunc, Wiesbaden, Alemania) se revistieron con hialuronano biotinilado (0,2 mg/mL, HyluMed® Sterile IUO Sodium hyaluronate, Genzyme Corp. Cambridge, MA, EE.UU.). Muestras de plasma se diluyeron 800 veces y se añadieron a las placas durante 2,5 horas a 37°C a pH 3,7. Para la curva patrón se utilizó hialuronidasa bovina (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.). La cantidad restante de hialuronano se determinó uniendo el complejo de avidina-biotina (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.), seguido de la adición de o-fenilendiamina (OPD – siglas en inglés) y H_2O_2 al 30%. Las placas se midieron en un lector a una DO de 492 nm.

Proceso de citometría de flujo de monocitos

Muestras de sangre entera se recogieron en tubos de litio-heparina apirógenos y luego se incubaron durante 10 min con 9 volúmenes de tampón de lisis de eritrocitos enfriado con hielo y se centrifugaron durante 10 min a 4°C. Las células remanentes se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo. Para el análisis citométrico de flujo se incubaron $0,5 \times 10^6$ células en tampón FACS mezclado con anticuerpo. Todos los reactivos se titularon para obtener resultados óptimos según se recomienda por los fabricantes. La tinción de la superficie de las células se realizó con CD14 (IgG2a) anti-humana de ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD18 (IgG1) marcada con alofocianina (APC) anti-humana y CD11b (IgG1) y CD62L (IgG1) anti-humana marcada con ficoeritrina (PE – siglas en inglés) (R&D Systems, San Jose, CA. EE.UU.). Anticuerpos testigo del isotipo apropiados se utilizaron para corregir la unión no específica de anticuerpos. Después de la tinción, las células se lavaron, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur. Los datos se analizaron con el software CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

Análisis estadístico

Todos los valores se proporcionan como medias \pm EMT. Las diferencias en las características de los valores de referencia entre el grupo de endotoxina-solución salina y el grupo de endotoxina-Etanercept se analizaron mediante el test T de muestras independientes. Cambios dentro de los grupos de tratamiento se analizaron mediante análisis de varianza de una vía. Los cambios entre grupos de tratamiento se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (tratamiento y tiempo de interacción). Correlaciones entre el volumen sistémico del glicocalix y otros parámetros se calcularon con el ensayo de correlación por rangos de Spearman (dos colas). Se consideró que $P < 0,05$ representa una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados

Respuestas clínicas a la infusión de endotoxina con o sin tratamiento previo con Etanercept

Antes de la infusión de endotoxina, no se observaron diferencias en las características clínicas el grupo de solución salina y el grupo de Etanercept. La infusión de endotoxina y las mediciones del volumen sistémico del glicocalix fueron bien toleradas y no se encontraron efectos adversos graves. La infusión de endotoxina provocó síntomas clínicos característicos tales como escalofríos, dolor de cabeza, mialgia y náuseas. Estos síntomas eran transitorios en los dos grupos, pero se producían con mayor frecuencia y más intensidad en el grupo de solución salina en comparación con el grupo de Etanercept (datos no mostrados). Los niveles de sTNFR2 se incrementaron significativamente después del tratamiento previo con Etanercept (de $1,8 \pm 0,2$ a 520 ± 34 ng/mL, $p < 0,0001$), indicando que el Etanercept fue administrado eficazmente. Los niveles en plasma permanecieron siendo elevados 4 horas después de la infusión de endotoxina en el grupo de Etanercept (646 ± 83 ng/mL), mientras que los niveles en plasma de sTNFR2 se veían sólo ligeramente afectados en el grupo de solución salina (de $2,1 \pm 0,3$ a $5,2 \pm 0,5$ ng/mL, 4 horas después de endotoxina, $p < 0,01$). La presión arterial, el ritmo cardiaco y la temperatura corporal cambiaron significativamente 4 horas después de la infusión de endotoxina en el grupo de solución salina (presión arterial sistólica: de 127 ± 11 a 119 ± 5 mm de Hg, ns; presión arterial diastólica: de 67 ± 8 a 51 ± 9 mm de Hg, $p < 0,01$; ritmo cardiaco: de 59 ± 6 a 82 ± 5 , $p < 0,01$; y temperatura corporal: de $36,6 \pm 0,5$ a $38,3 \pm 0,4$ °C, $p < 0,01$, en comparación con los valores de referencia para todos los parámetros). Etanercept atenuaba estos cambios (presión arterial sistólica: de 125 ± 7 a 123 ± 10 mm de Hg, ns; presión arterial diastólica: de 69 ± 6 a 67 ± 6 mm de Hg, ns, ritmo cardiaco: de 62 ± 4 a 69 ± 3 , ns; y temperatura corporal: de $36,6 \pm 0,5$ a $37,3 \pm 0,5$ °C, ns, en comparación con los valores de referencia para todos los parámetros).

Perturbación del glicocalix inducida por endotoxina atenuada con Etanercept

Los volúmenes sistémicos del glicocalix de los valores de referencia eran equiparables entre los dos grupos (grupo de solución de salina: $1,6 \pm 0,6$ frente al grupo de Etanercept: $1,7 \pm 0,5$ litros, ns). Los volúmenes sistémicos del glicocalix se redujeron significativamente después de la infusión de endotoxina en el grupo de solución salina (hasta $0,8 \pm 0,4$ litros, $p < 0,01$), predominantemente debido a una reducción en el volumen de distribución de Dextran 40 ($4,7 \pm 0,6$ a $4,1 \pm 0,9$ litros, $p < 0,05$, véanse las Figuras 1a y b). Aumentaron los volúmenes de plasma circulante ($3,1 \pm 0,4$ a $3,3 \pm 0,7$ litros, $p < 0,05$), acompañados por una pequeña caída en los valores del hematocrito ($0,44 \pm 0,03$ a $0,41 \pm 0,03$ %, $p < 0,01$). Además, la endotoxina dio como resultado un incremento doble de la tasa de aclaramiento sistémico (τ^{-1}) de Dextran 40 (de $0,008 \pm 0,005$ a $0,015 \pm 0,008$ min^{-1} , $p < 0,01$).

Etanercept atenuaba la pérdida de volumen del glicocalix inducida por endotoxina (hasta $1,1 \pm 0,2$ litros, $p < 0,01$) basado en una reducción en el volumen de distribución de Dextran 40 ($4,6 \pm 0,6$ a $3,9 \pm 0,5$ litros, $p < 0,05$) sin afectar al volumen de plasma circulante ($2,9 \pm 0,5$ a $2,8 \pm 0,6$ litros, ns), valores del hematocrito ($0,43 \pm 0,02$ a $0,42 \pm 0,02$ %, ns) o tasa de aclaramiento de Dextran 40 sistémica ($0,009 \pm 0,002$ a $0,009 \pm 0,001$ min^{-1} , ns).

Con respecto al glicocalix microvascular, la infusión de endotoxina condujo a una reducción en el grosor mediano del

glicocalix microvascular en el grupo de solución salina (de 1,1 a 0,4 μm , $p < 0,01$, véanse las Figuras 1c y 1d). La pérdida del glicocalix dio como resultado un llenado de sangre capilar ligeramente incrementado según se refleja por una anchura incrementada de la columna de eritrocitos capilar (de 4,9 \pm 0,2 a 5,3 \pm 0,3 μm , ns), antes del paso de leucocitos. Además, la pérdida del glicocalix vino acompañada por una reducción en los diámetros capilares anatómicos (de 7,0 \pm 0,2 a 6,2 \pm 0,3 μm , $p < 0,05$). La densidad capilar disminuyó significativamente tras el estímulo con endotoxina (de 60 \pm 18 por campo a 44 \pm 16, $p < 0,01$) con cambios similares en el grupo de tratamiento previo con Etanercept (de 59 \pm 7 a 43 \pm 15, $p < 0,01$).

Cambios en los componentes del glicocalix tras infusión de endotoxina

Los niveles de hialuronano en plasma, un marcador de la diseminación del glicocalix, se elevaron significativamente dentro de la primera hora después de la infusión de endotoxina en el grupo de solución salina (de 62 \pm 18 a 85 \pm 24 ng/mL, $p < 0,05$), mientras que Etanercept reducía la diseminación inducida por endotoxina (de 58 \pm 13 a 46 \pm 10 ng/mL, $p < 0,05$) (Figura 2a). La actividad de hialuronidasa en el plasma disminuyó significativamente 4 horas después de la infusión de endotoxina en el grupo de solución salina (-56 \pm 20%, comparado con los valores de referencia, $p < 0,01$), mientras que la actividad de hialuronidasa no se vio afectada en el grupo de Etanercept (-8 \pm 14%, comparado con los valores de referencia ns; Figura 2b). De manera notable, los niveles en plasma de sulfato de heparano no cambiaban significativamente durante las 4 horas después de la estimulación con endotoxina con el grupo de tratamiento previo (grupo de solución salina; de 5,3 \pm 1,1 a 5,5 \pm 1,2 $\mu\text{g/mL}$, frente al grupo de Etanercept: 5,4 \pm 1,3 a 5,1 \pm 1,0 $\mu\text{g/mL}$, ns, comparado con los valores de referencia). Sin embargo, 24 horas después de la infusión de endotoxina, los niveles de sulfato de heparano en plasma aumentaron más en el grupo de solución salina (11,2 \pm 2,1 $\mu\text{g/mL}$, frente al grupo de Etanercept 7,4 \pm 1,5 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,01$).

El tratamiento con Etanercept reducía las respuestas inflamatorias y de coagulación inducidas por TNF α

Marcadores inflamatorios aumentaron en el grupo de solución salina después del estímulo con endotoxina (IL-6: de 4,2 \pm 6,3 a 678 \pm 427 pg/mL y CRP: de 0,5 \pm 0,4 a 26,7 \pm 7,6 mg/L, $p < 0,01$ en comparación con los valores de referencia, véanse las Figuras 3a y b). Etanercept reducía significativamente este aumento (IL-6: de 4,6 \pm 3,1 a 127 \pm 98 pg/mL, $p < 0,05$ en comparación con los valores de referencia, y CRP: de 0,6 \pm 0,4 a 16,0 \pm 3,4 mg/L, $p < 0,01$ comparado con los valores de referencia, Figuras 3a y b). En paralelo, 4 horas después de endotoxina, el número de leucocitos circulantes se dobló en los dos grupos de tratamiento en comparación con los valores de referencia.

Con respecto a la diferenciación de leucocitos después de la infusión de endotoxina, se observó una caída significativa en el recuento de monocitos en 76 \pm 29% en el grupo de solución salina a las 4 horas ($p < 0,01$ en comparación con los valores de referencia), mientras que Etanercept fue asociado con una reducción menos profunda de 51 \pm 32% ($p < 0,05$ comparado con los valores de referencia). No existía diferencia alguna entre los recuentos de monocitos CD14 $^{+}$ entre los dos grupos (27 \pm 10 frente a 26 \pm 13%, ns). Sin embargo, el recuento de monocitos CD11b $^{+}$ /CD18 $^{+}$ (complejo Mac-1) era mayor después de la solución salina en comparación con Etanercept (mediana 0,82 \pm 0,2 frente a 0,65 \pm 0,1, $p < 0,01$). Finalmente, el porcentaje de monocitos que expresan CD62L $^{+}$ (L-selectina) disminuyó como máximo 4 horas después de la endotoxina en el grupo de solución salina, mientras que en el grupo de Etanercept se observó un incremento (-8 \pm 37% frente a +66 \pm 42%, $p < 0,05$).

En paralelo, marcadores de la generación de trombina inducida por endotoxina y la subsiguiente fibrinólisis en el grupo de solución salina se incrementaron significativamente, comenzando 3 horas después de la estimulación con endotoxina (F1 + 2; de 0,3 \pm 0,1 a 2,8 \pm 1,5 nmol/L y dímero D: de 0,2 \pm 0,1 a 0,4 \pm 0,1 mg/L, $p < 0,05$ comparado con los valores de referencia; Figuras 3c y d), mientras que Etanercept reducía significativamente este incremento (F1 + 2; de 0,3 \pm 0,1 a 2,1 \pm 0,9 nmol/L, y dímero D: de 0,2 \pm 0,1 a 0,3 \pm 0,1 mg/L, $p < 0,05$). Cuando los datos en los valores de referencia y 4 horas después de la infusión de endotoxina se agruparon para los dos grupos, estaba presente una correlación inversa entre el volumen sistémico del glicocalix y los niveles de F1 + 2 o de dímero D ($r = 0,74$ y $r = -0,60$, respectivamente, ambos $p < 0,01$).

Conclusiones

Estos datos demuestran que la actividad inflamatoria, mediada en parte por TNF α , conduce a la perturbación del glicocalix endotelial. Este mecanismo contribuye al incremento inducido por la inflamación en la vulnerabilidad vascular. En línea con los presentes datos, la invención proporciona enfoques de diagnóstico y terapéuticos a enfermedades inflamatorias y vasculares, que implican la detección y modulación de la salud del glicocalix.

EJEMPLO 2

El presente ejemplo proporciona un ejemplo comparativo entre el método de la presente invención y dos métodos de la técnica anterior. El método de la presente invención se compara con (1) el método de la técnica anterior en el que se utiliza un ensanchamiento transitorio de las anchuras de los RBC inducido por leucocitos y (2) el método de la

técnica anterior en el que se evalúa el estado del glicocalix utilizando trazadores (véase la Figura 4).

El método de la presente invención (Figuras 4A y 4C) mide el estado del glicocalix (2) endotelial en vasos sanguíneos capilares (1) individuales perfundidos con glóbulos rojos (3) realizando mediciones de distribución por tamaños que determinan la anchura de los glóbulos rojos (RBCW), el diámetro de los vasos (VD), la reserva de volumen capilar y la anchura del glicocalix (GW). Para que tenga lugar una única medición, los vasos sanguíneos requieren una visualización de 5 segundos, en donde se realizan más de 100 mediciones de la RBCW en al menos 10 vasos sanguíneos. El número de mediciones se puede incrementar en al menos 10 veces visualizando durante aproximadamente 1 minuto. La distribución por tamaños de los valores de la RBCW medidos permite una evaluación precisa del estado del glicocalix.

2.1 Ampliación transitoria de la anchura de los RBC inducida por leucocitos

El método de la técnica anterior basado en la ampliación transitoria de la anchura de los RBC inducida por leucocitos (Figura 4B) mide aproximadamente 2 leucocitos por medición en todos los vasos sanguíneos visualizados y, por lo tanto, requiere un tiempo de visualización de al menos 10 minutos antes de recoger datos suficientes para determinar el estado del glicocalix. Además de ello, se señala que este tipo de medición sólo se puede realizar en vasos sanguíneos que permiten, aunque sea raro, el paso de leucocitos (4). Para vasos sanguíneos pequeños tales como microvasos, se requieren tiempos de visualización extremadamente prolongados.

Primeramente, los datos de la anchura del glicocalix obtenidos con este método son equiparables a las mediciones realizadas con el método de la presente invención. No obstante, se señala que los márgenes de error son más pequeños, es decir, el porcentaje de nivel de confianza es mayor, con los datos de la presente invención con respecto al método de la técnica anterior. Esto se puede explicar por las diferencias en anchura de los leucocitos individuales.

En segundo lugar, los datos se obtienen 10-100 veces más rápidamente con el método de la presente invención en comparación con el método de la técnica anterior basado en el ensanchamiento transitorio inducido por leucocitos de la anchura de los RBC.

2.2 Método del trazador

Mediciones de la técnica anterior del estado del glicocalix se realizan utilizando la adición de trazadores en el torrente sanguíneo. Este método requiere, tomar sangre de un paciente, marcar la sangre fuera del paciente e inyectar la sangre marcada al paciente. Después de varias horas, habitualmente 4, la sangre se extrae del paciente y se analiza. Este análisis proporciona información relacionada con el estado del glicocalix.

Comparado con el método de la presente invención:

- (1) este método de la técnica anterior es muy laborioso y requiere mucho tiempo;
- (2) este método de la técnica anterior es muy desagradable para los pacientes. De hecho, algunos pacientes desarrollan una reacción alérgica a los trazadores, poniendo en riesgo la vida del paciente;
- (3) además, dado que los vasos sanguíneos más pequeños sólo permiten una perfusión limitada por parte de los glóbulos rojos, este método de la técnica anterior proporciona sólo una medición del estado del glicocalix que puede no ser fiable.

EJEMPLO 3

El presente ejemplo demuestra que al establecer el estado del glicocalix de acuerdo con el método de la presente invención, se hace posible la detección rápida de cambios en el estado del glicocalix.

Materiales y métodos

El estado del glicocalix endotelial en vasos sanguíneos capilares individuales se midió realizando mediciones de la distribución por tamaños, determinando con ello la anchura de los glóbulos rojos (RBCW), el diámetro de los vasos (VD), la reserva de volumen capilar y la anchura del glicocalix (GW). Se obtuvieron imágenes videomicroscópicas sublinguales clínicas utilizando un sistema de vídeo microscopio MicroScan (MicroVision Medical, Holanda). El sistema es un vídeo microscopio de mano con iluminación por LED equipado con un aumento 5x. Para la evaluación mejorada de la velocidad de los glóbulos rojos, se introduce una iluminación estroboscópica. El sistema tiene una salida de vídeo estándar (PAL o NTSC) que está conectada a un dispositivo de captura AD para convertir las

imágenes en una señal digital que es registrada directamente en el disco duro de un ordenador.

La anchura de los glóbulos rojos (RBCW) se presenta aquí como el valor mediano de múltiples mediciones de la anchura de los glóbulos rojos en un segmento microvascular que facilita la perfusión de los glóbulos rojos en fila india. El diámetro de los vasos (VD) es el valor máximo o valor p99 de múltiples mediciones de la anchura de los glóbulos rojos en un segmento microvascular que facilita la perfusión de los glóbulos rojos en fila india y la anchura del glicocalix es la dimensión del hueco entre la anchura de los glóbulos rojos y el diámetro de los vasos. La reserva del volumen capilar (CVR) es la relación de $(VD)^2$ frente a $(RBCW)^2$.

El estado del glicocalix se determinó realizando mediciones de distribuciones por tamaños, determinando con ello la RBCW a partir de imágenes obtenidas con microscopios clínicos. El nuevo algoritmo de acuerdo con la presente invención, que deriva la anchura de los glóbulos rojos, el diámetro de los vasos, la anchura del glicocalix y la reserva del volumen capilar directamente a partir de mediciones secuenciales de la anchura de la columna de glóbulos rojos en un vaso sanguíneo dado se utilizó para las mediciones. El método analizaba la distribución de más de 1000 valores de la RBCW en un vaso dado, revelando con ello que sólo un pequeño porcentaje de las mediciones de la RBCW se extiende en el dominio del glicocalix sobre la membrana endotelial luminal de la que se excluyen generalmente los RBCs. Sólo se requerían unos pocos segundos de perfusión de RBC en un microvaso dado para permitir el análisis del estado del glicocalix y se analizaron simultáneamente todos los microvasos en un campo de visión dado. El registro de un único campo de visión duró sólo unos segundos, y el registro de múltiples campos de visión se consiguió en el espacio de uno de varios minutos. Como resultado, se obtuvieron distribuciones precisas de la anchura de los glóbulos rojos, diámetro de los vasos, anchura del glicocalix y reserva del volumen capilar a partir de más de 100 vasos sanguíneos.

Resultados

Las mediciones del estado del glicocalix se compararon entre sujetos tratados con nitroglicerol por spray sublingual y sujetos testigo no tratados. El nitroglicerol por spray sublingual proporciona un estímulo controlado, ya que se sabe que el nitroglicerol provoca una lesión al glicocalix. Tal como se muestra en las Figuras 5a y 5b, se puede observar una clara distinción entre el estado del glicocalix en sujetos tratados y no tratados. La detección del cambio dinámico del estado del glicocalix tal como se realiza en el presente ejemplo podría detectarse en cuestión de minutos. El estado del glicocalix se correlacionaba directamente con la RBCW (Figura 5a frente a 5b).

Los resultados demuestran también que un análisis de sólo 100 RBCs proporcionaba resultados similares.

Conclusiones

Estos datos demuestran que el establecimiento del estado del glicocalix se puede realizar utilizando los métodos de la presente invención. Además, se demuestra que el método de la presente invención proporciona un modo rápido y preciso para detectar cambios dinámicos en el estado del glicocalix.

EJEMPLO 4

El presente ejemplo demuestra que al establecer el estado del glicocalix utilizando el método según se describe en el Ejemplo 2, la presente invención permite la diferenciación entre el estado del glicocalix en casos de testigos cancerígenos y sanos. También, asimismo se puede evaluar el efecto del tratamiento.

Resultados

Las mediciones del estado del glicocalix se compararon entre sujetos a los que se les diagnosticó cáncer y sujetos testigos sanos. Tal como se muestra en las Figuras 6a y 6b, se puede observar una clara distinción entre el estado del glicocalix en sujetos sanos y cancerígenos. La detección del cambio dinámico del estado del glicocalix tal como se realiza en el presente ejemplo podría detectarse en cuestión de minutos.

Después del tratamiento de los sujetos diagnosticados con un compuesto inhibidor del receptor VEGF, el efecto de este tratamiento se puede visualizar tal como se muestra en las Figuras 7a y 7b.

Conclusiones

Estos datos demuestran que el estado del glicocalix se puede utilizar para diagnosticar la lesión del glicocalix, en este ejemplo la lesión causada por cáncer. Además, se puede evaluar el efecto del tratamiento del cáncer con compuestos específicos.

EJEMPLO 5

El presente ejemplo demuestra que al establecer el estado del glicocalix utilizando el método según se describe en el Ejemplo 2, la presente invención permite la diferenciación entre el estado del glicocalix en casos de testigos con diabetes y sanos. También, asimismo se puede evaluar el efecto del tratamiento.

5 21 pacientes varones, no fumadores, con diabetes mellitus tipo 2 sin signos vitales de enfermedad macrovascular, definidos como un historial de infarto de miocardio, apoplejía, enfermedad vascular periférica o signos de enfermedad vascular en el examen físico, se utilizaron como el grupo de diabetes. Como grupo testigo sirvieron trece sujetos varones normoglicémicos, no fumadores, sanos.

10 **Resultados**

Las mediciones del estado del glicocalix se compararon entre sujetos a los que se les diagnosticó diabetes (sin micro-albuminuria) y sujetos testigos sanos. Tal como se muestra en las Figuras 8a y 8b, se puede observar una clara distinción entre el estado del glicocalix en sujetos sanos y diabéticos. La detección del cambio dinámico del estado del glicocalix tal como se realiza en el presente ejemplo podría detectarse en cuestión de minutos.

Después del tratamiento de los sujetos diagnosticados con un compuesto glicomimético, el efecto de este tratamiento se puede visualizar tal como se muestra en las Figuras 9a y 9b.

20 **Conclusiones**

Estos datos demuestran que el estado del glicocalix se puede utilizar para diagnosticar la lesión del glicocalix, en este ejemplo la lesión causada por diabetes. Además, se puede evaluar el efecto del tratamiento de la diabetes con compuestos específicos.

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método ex vivo para evaluar el estado del glicocalix, que comprende las etapas de:
- a. medir la anchura de al menos 10 glóbulos rojos en una imagen o un registro microscópico de al menos un vaso sanguíneo microvascular;
 - 5 b. repetir la etapa (a) para al menos 10 vasos sanguíneos microvasculares; y
 - c. obtener una estimación de la anchura del glicocalix a partir de la distribución por tamaños de mediciones de la anchura de la columna de glóbulos rojos; en donde la anchura del glicocalix es igual a la mitad de la diferencia entre el valor de la anchura máxima de los glóbulos rojos (valor P99 de la distribución de la anchura de los glóbulos rojos; o RBCWmax) y el valor mediano de la anchura de los glóbulos rojos (valor P50 de la distribución de la anchura de los glóbulos rojos; o RBCW mediano).;
 - 10 evaluando con ello el estado del glicocalix.
- 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, adicionalmente, la etapa de:
- d. determinar la reserva de volumen capilar a partir de la distribución por tamaños de las mediciones de la anchura de los glóbulos rojos, en donde la reserva de volumen capilar es el cuadrado de la anchura máxima de los glóbulos rojos, dividida por el cuadrado de la anchura media de los glóbulos rojos.
 - 15
- 3.- Un método ex vivo para identificar compuestos, factores de riesgo cardiovascular o factores del estilo de vida que modulan el estado del glicocalix, que comprende las etapas de:
- a. medir la anchura de al menos 10 glóbulos rojos en una imagen o un registro microscópico de al menos un glóbulo rojo microvascular obtenido en presencia y ausencia de dicho compuesto, factor de riesgo cardiovascular o factor del estilo de vida;
 - 20 b. repetir la etapa (a) para al menos 10 vasos sanguíneos microvasculares;
 - c. evaluar el estado del glicocalix de acuerdo con el método de la reivindicación 1 ó 2,
 - 25 en donde una diferencia en el estado del glicocalix en presencia y ausencia de dicho compuesto, factor de riesgo cardiovascular o factor del estilo de vida identifica dicho compuesto, factor de riesgo cardiovascular o factor del estilo de vida, como modulador del estado del glicocalix.
 - 30
- 4.- Un programa de ordenador almacenado en un medio legible por ordenador o un dispositivo de ordenador autónomo similar, configurado para:
- a. leer los datos de distribución de la RBCW; y
 - 35 b. determinar el estado del glicocalix de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5.- Un método ex vivo para diagnosticar una enfermedad vascular o la susceptibilidad a una enfermedad vascular en un sujeto, que comprende detectar en dicho sujeto una alteración en el estado del glicocalix, determinado de acuerdo con el método ex vivo de la reivindicación 1 ó 2, que comprende opcionalmente, de manera adicional, determinar ex vivo la permeabilidad del glicocalix, la diseminación del glicocalix y/o la actividad de una o más enzimas del metabolismo del glicocalix en una muestra tomada del sujeto.
- 40

6.- El método ex vivo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho diagnóstico se lleva a cabo en una imagen o un registro microscópico obtenido de:

 - a. sujetos con una afección o enfermedad inflamatoria;
 - 45 b. sujetos que tienen uno o más factores de riesgo elegidos de la edad, fumar, hiperglucemia y dislipidemia; y/o
 - c. sujetos que tienen una o más patologías de riesgo elegidas de lesión por isquemia-reperusión, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, hiperglucemia, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, dislipidemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, cáncer, enfermedad infecciosa y trauma.
 - 50

7.- Un método ex vivo para diagnosticar una susceptibilidad aterogénica a estimulaciones inflamatorias en un sujeto, que comprende detectar en dicho sujeto una alteración en el estado del glicocalix, determinado de acuerdo con el método de la reivindicación 1 ó 2, que comprende opcionalmente, además, determinar ex vivo la permeabilidad del glicocalix, la diseminación del glicocalix y/o la actividad de una o más enzimas para el metabolismo del glicocalix en una muestra tomada del sujeto.
- 55

8.- El método de las reivindicaciones 5-7, que comprende detectar en dicha muestra la presencia y/o concentración de moléculas derivadas del glicocalix que incluyen oligosacáridos o polisacáridos, glicosaminoglicanos, hialuronano, sulfato de heparano o proteoglicanos; enzimas que catalizan el anabolismo o catabolismo del glicocalix, que incluyen
- 60

hialuronidasa, mieloperoxidasa, heparinasa y otras exo- y endo-glicosidasas; y/o sustancias que se asocian con el glicocalix endógenas o exógenas, incluidas proteínas similares a lectina endógenas que normalmente se asocian con el glicocalix.

- 5 9.- El método de la reivindicación 8, en el que dicha detección es mediante un dispositivo biosensor.

FIGURA 1

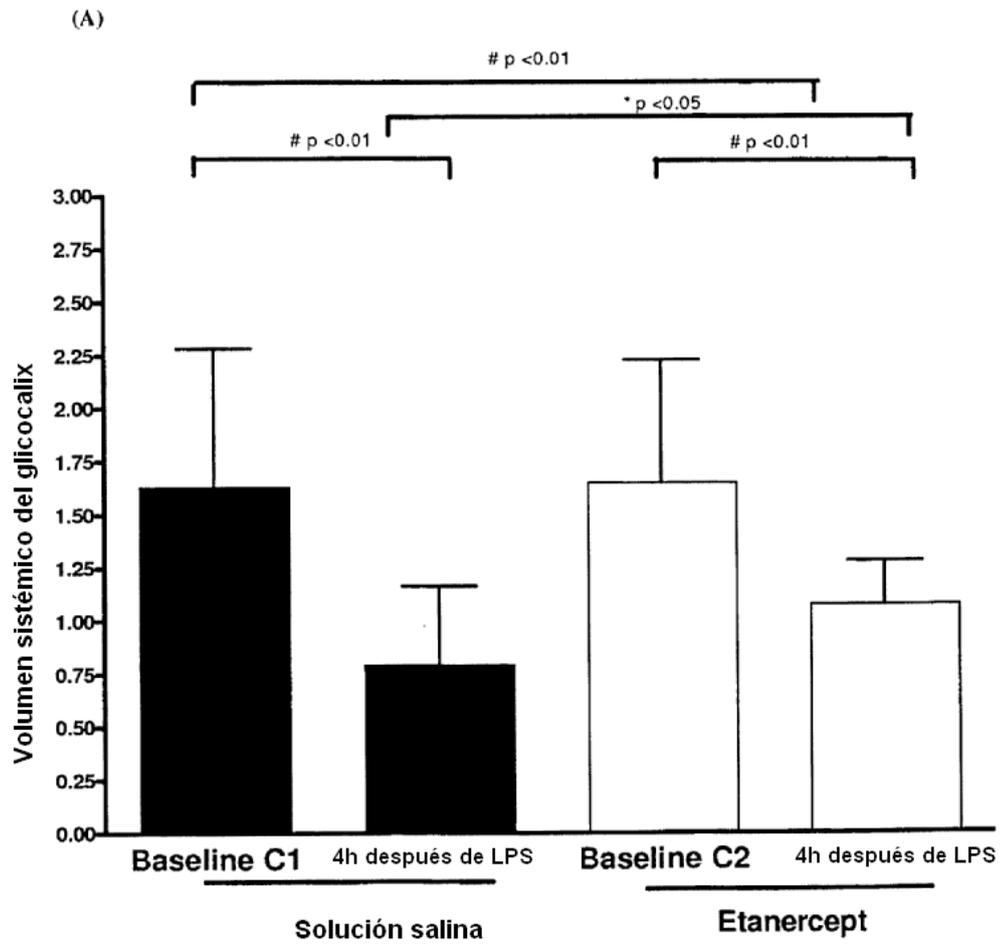


FIGURA 1 continuación

(B)

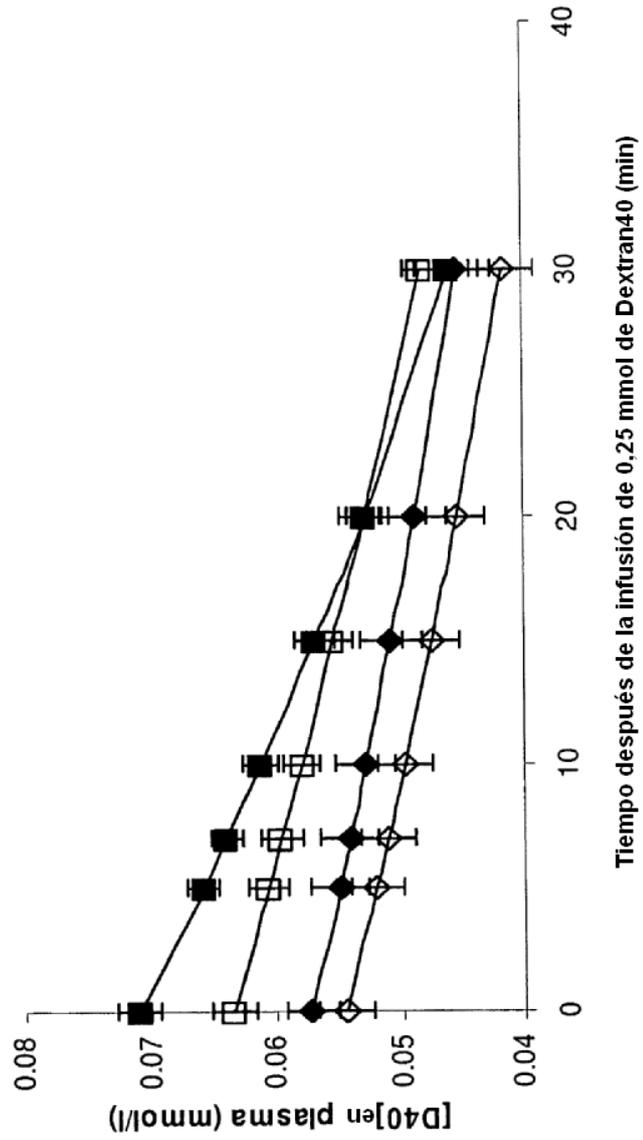
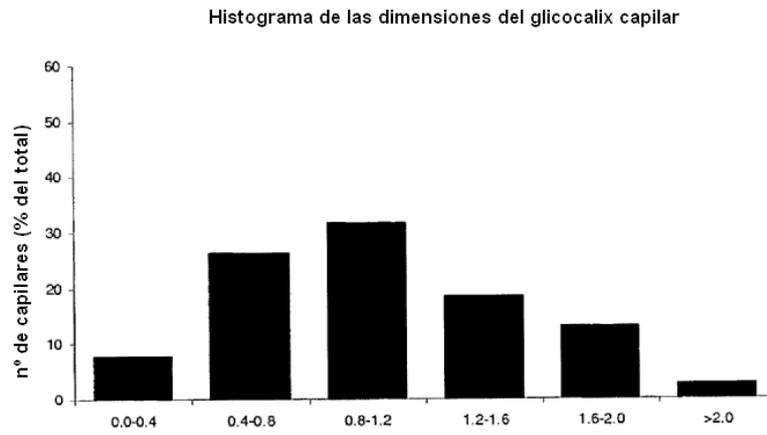


FIGURA 1 continuación

(C)



(D)

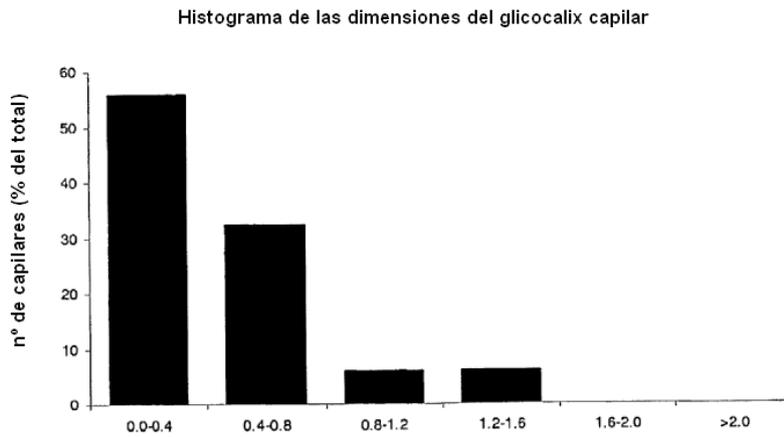


FIGURA 2

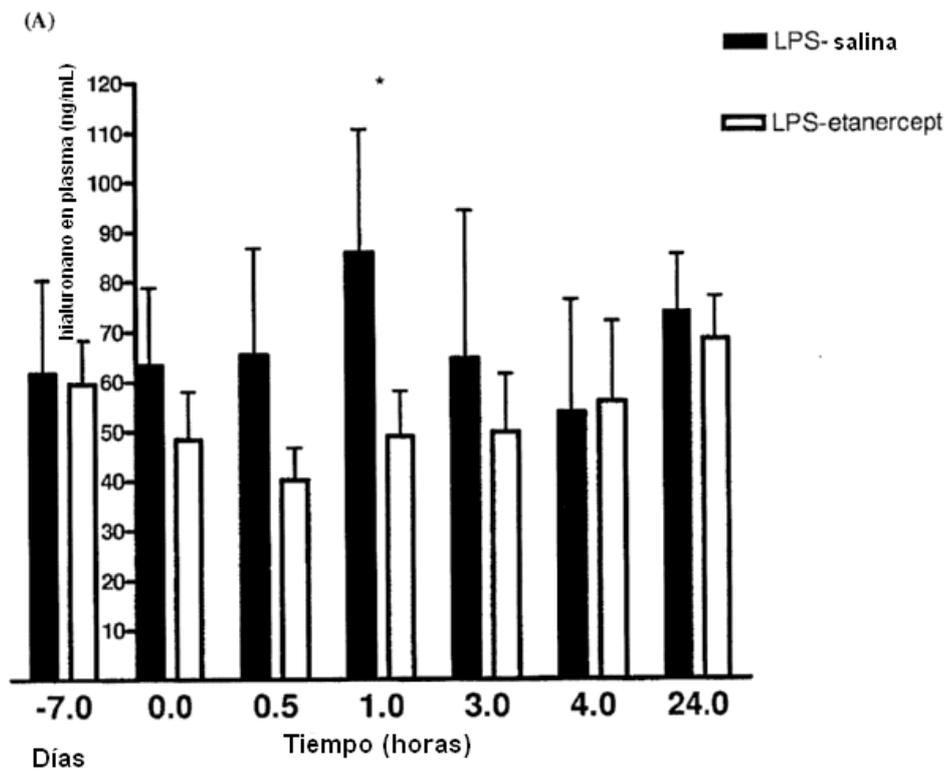


FIGURA 2 continuación

(B)

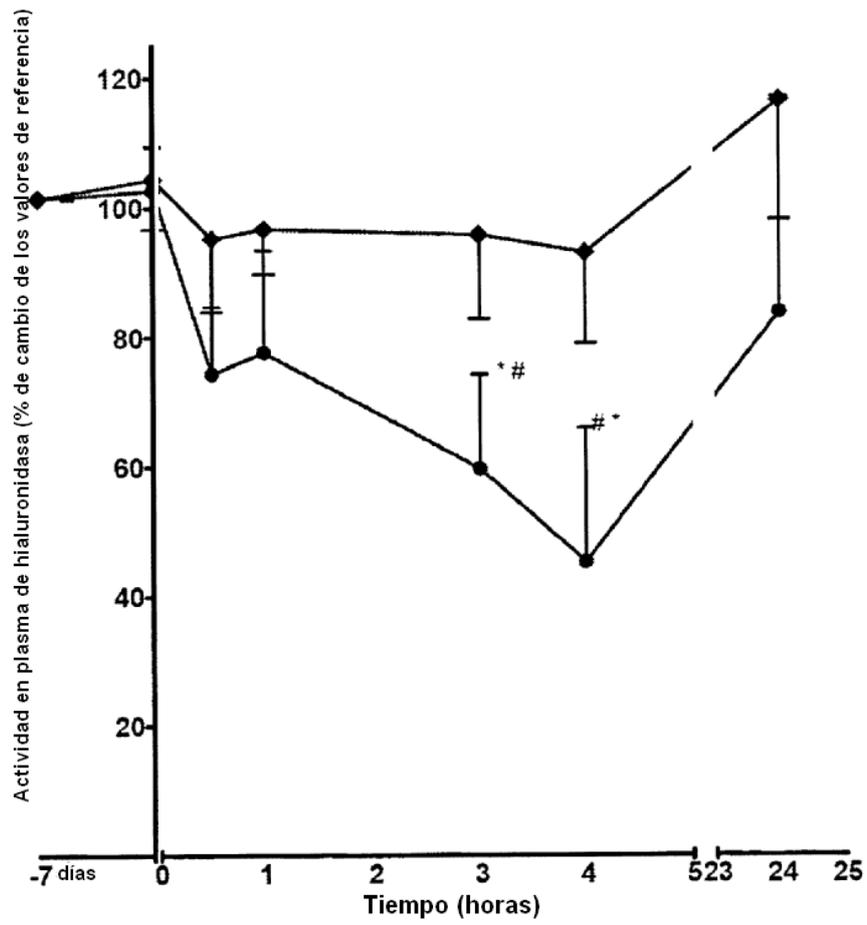


FIGURA 3

(A)

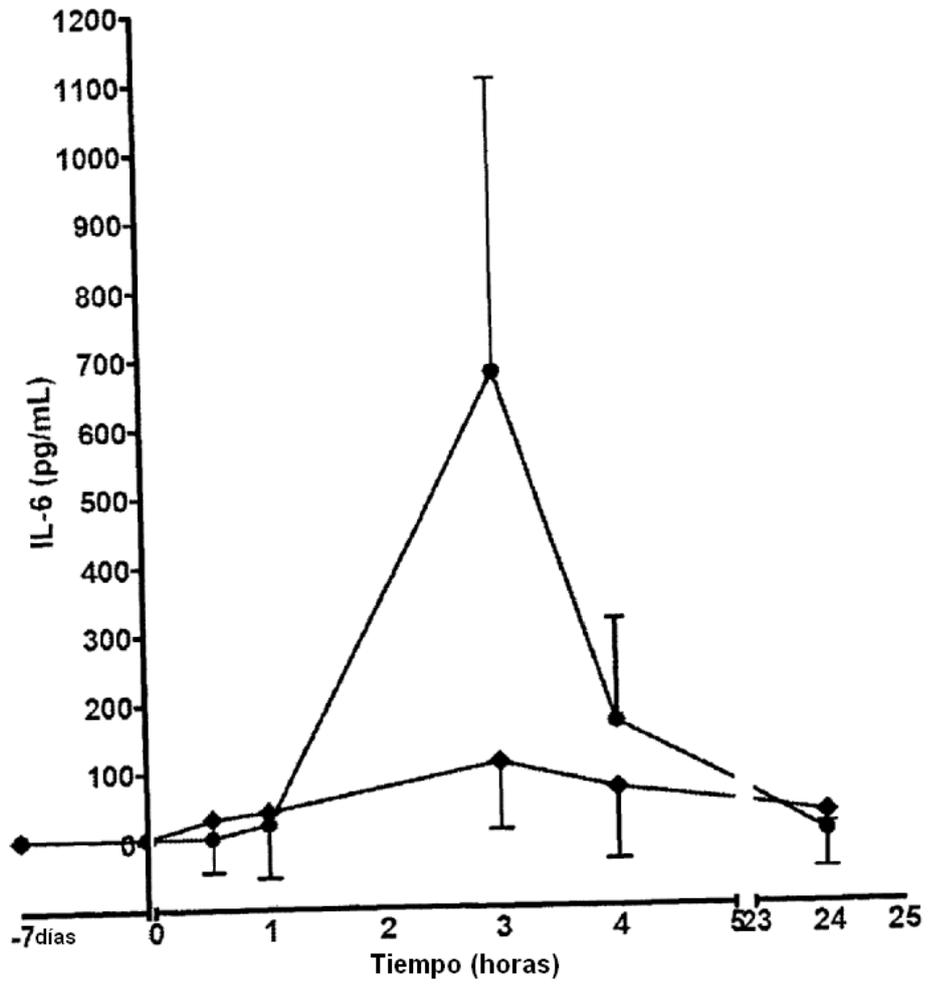


FIGURA 3 continuación

(B)

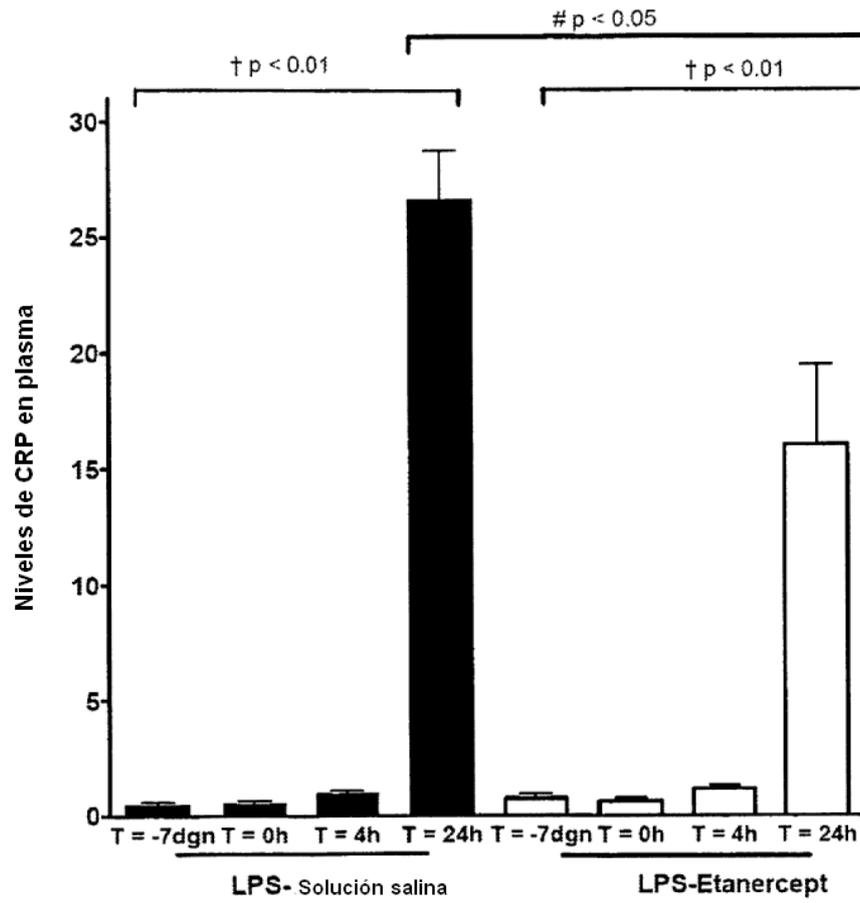


FIGURA 3 continuación

(C)

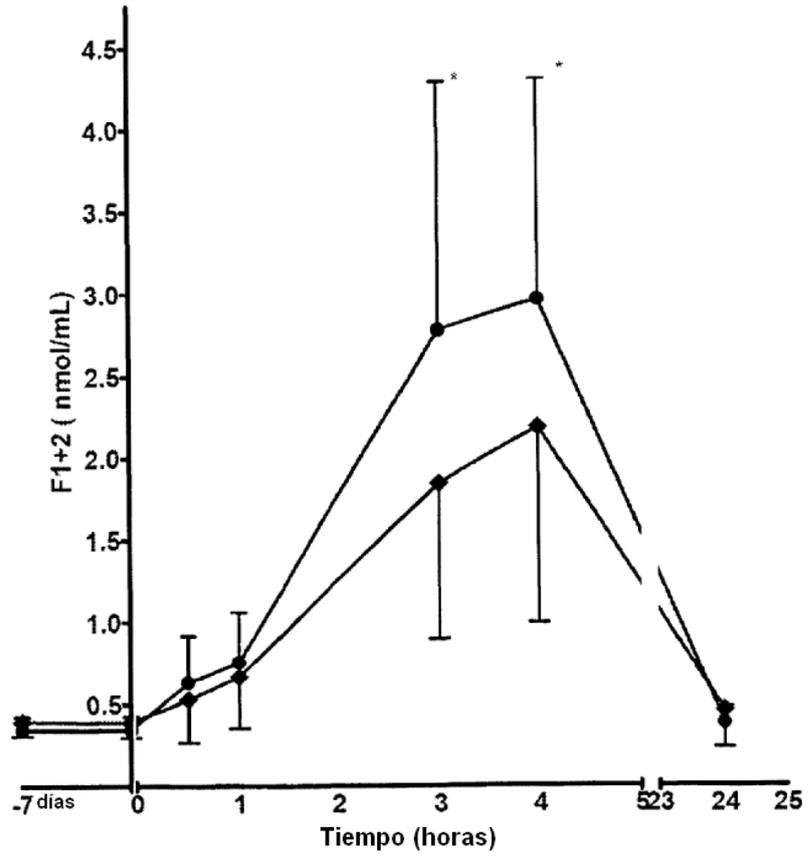


FIGURA 3 continuación

(D)

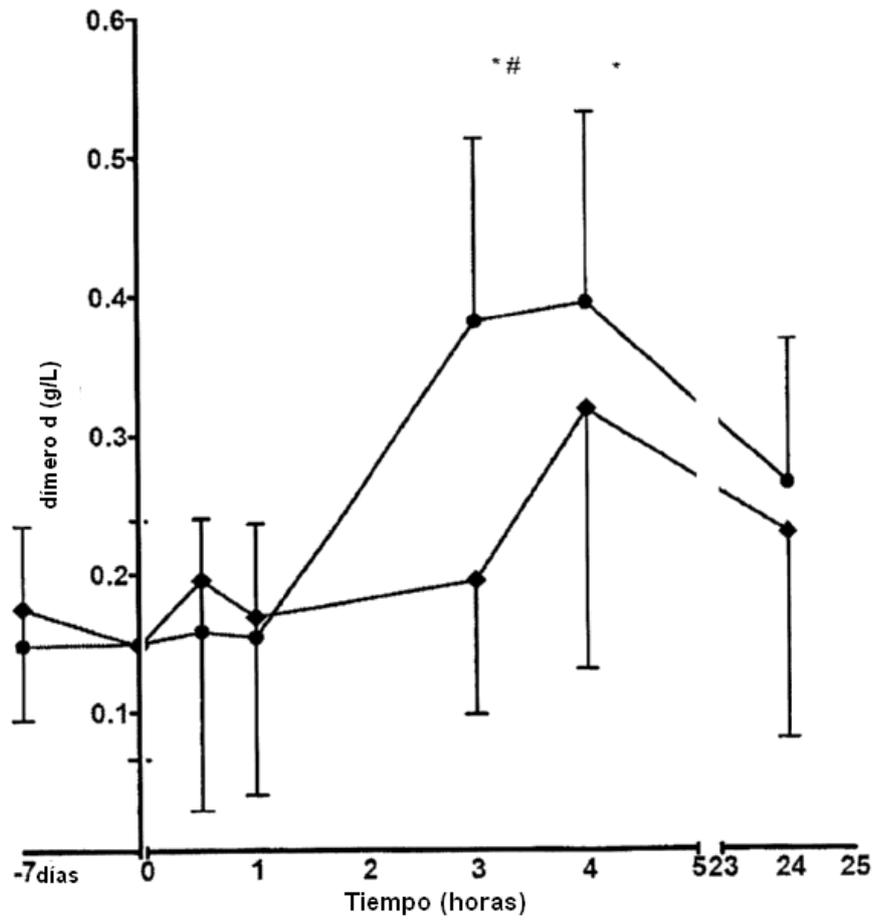


Figura 4

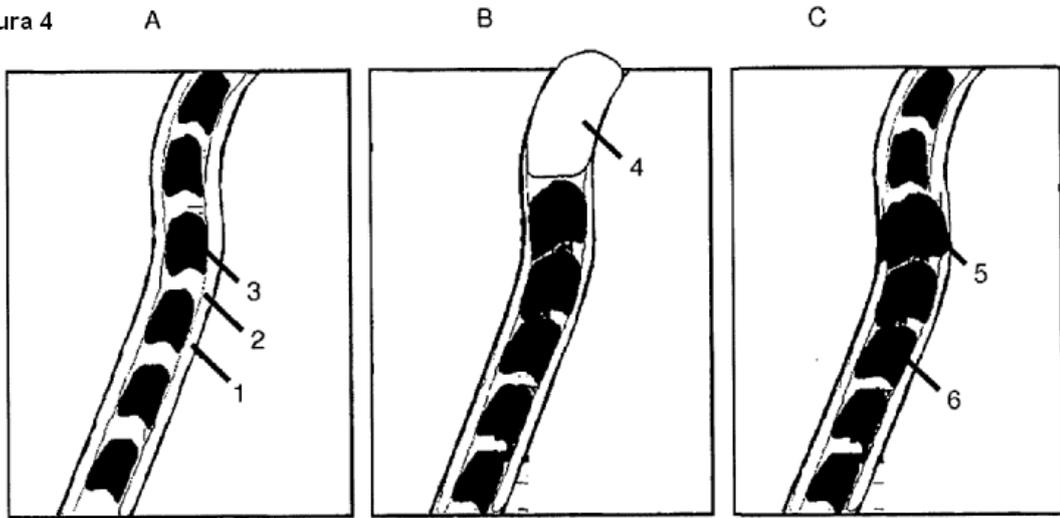
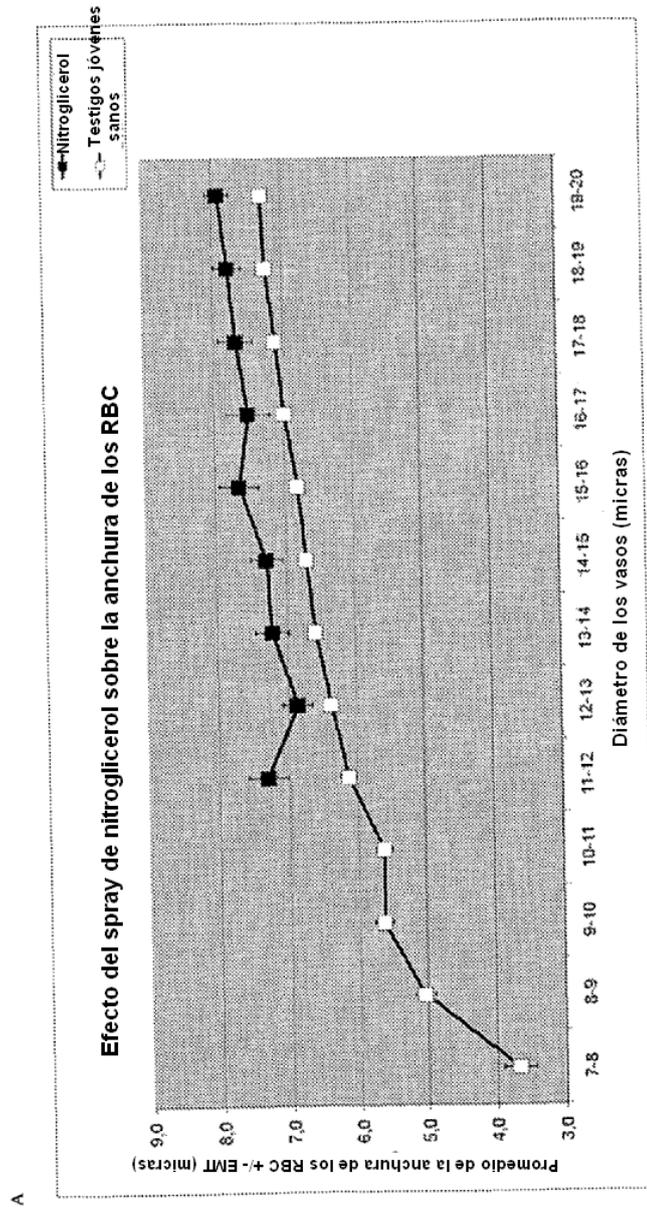
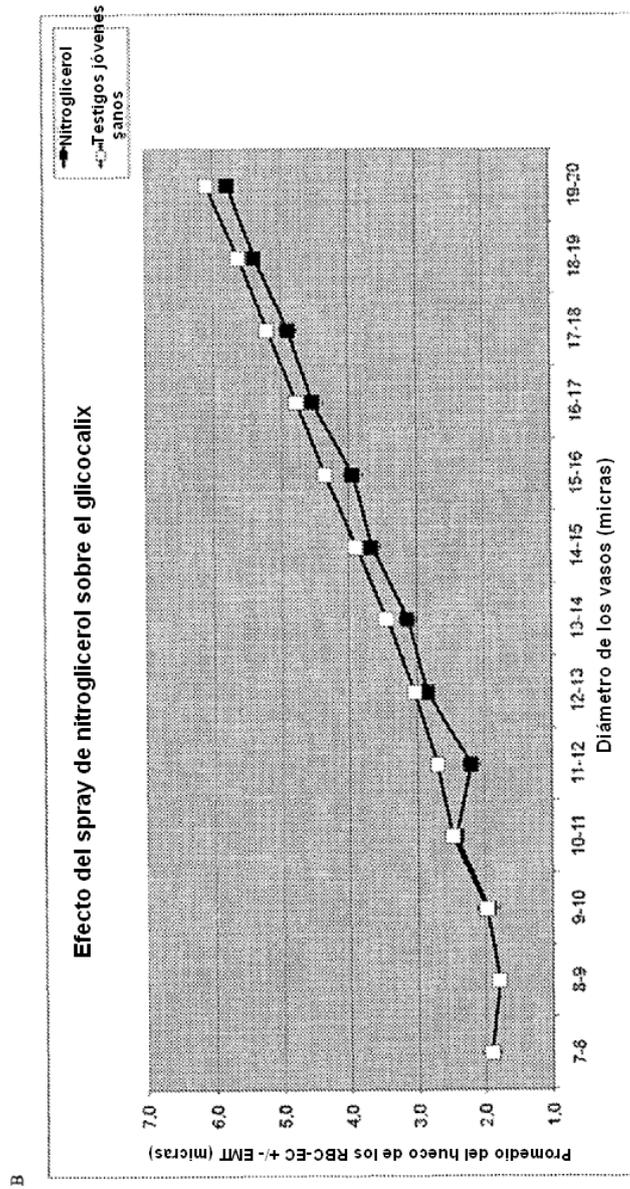


Figura 5





B

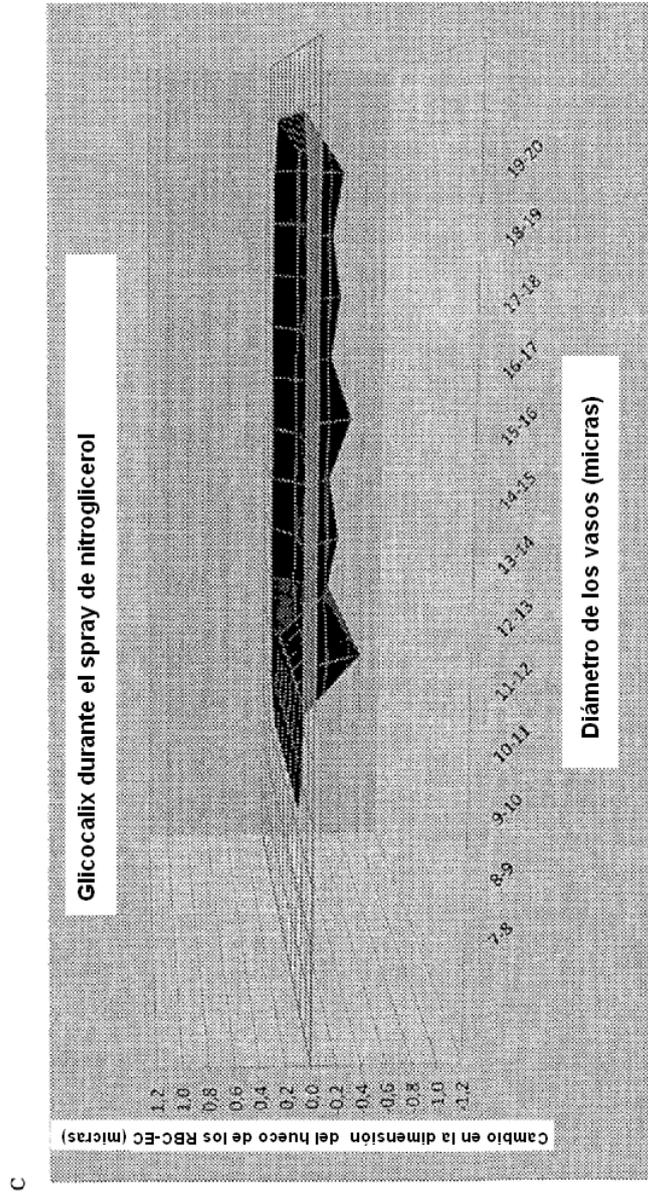
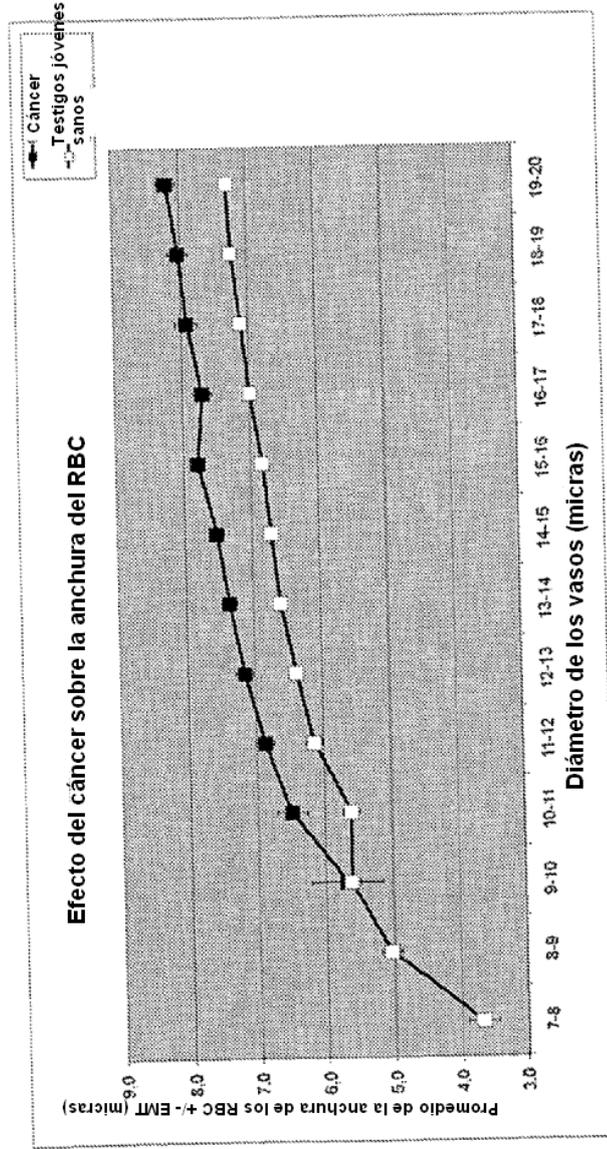
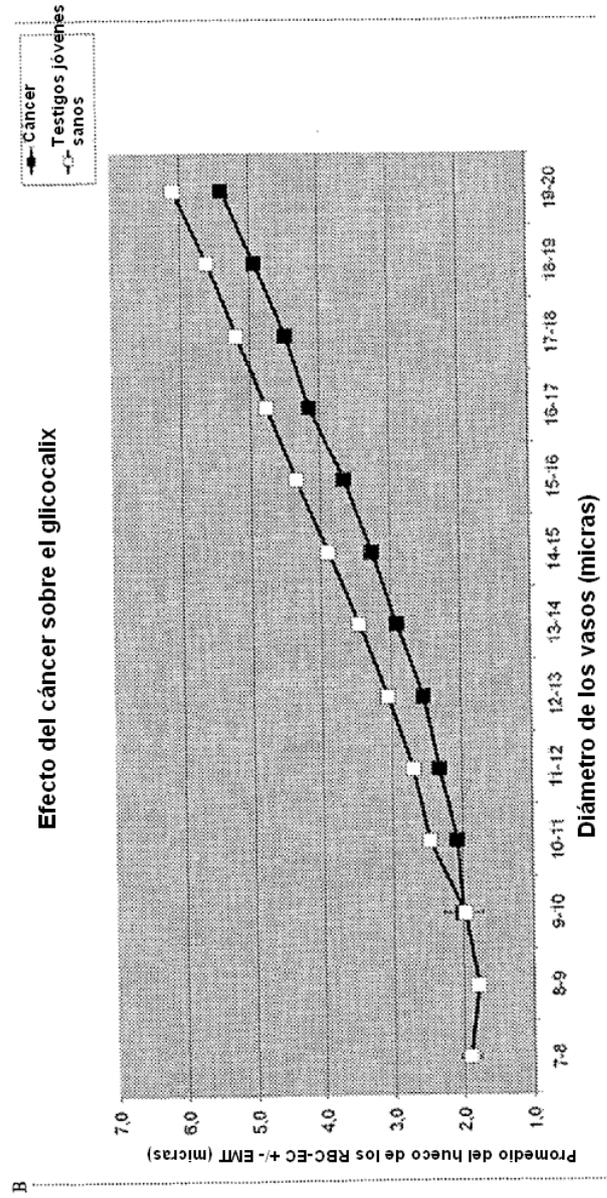


Figura 6

A





C

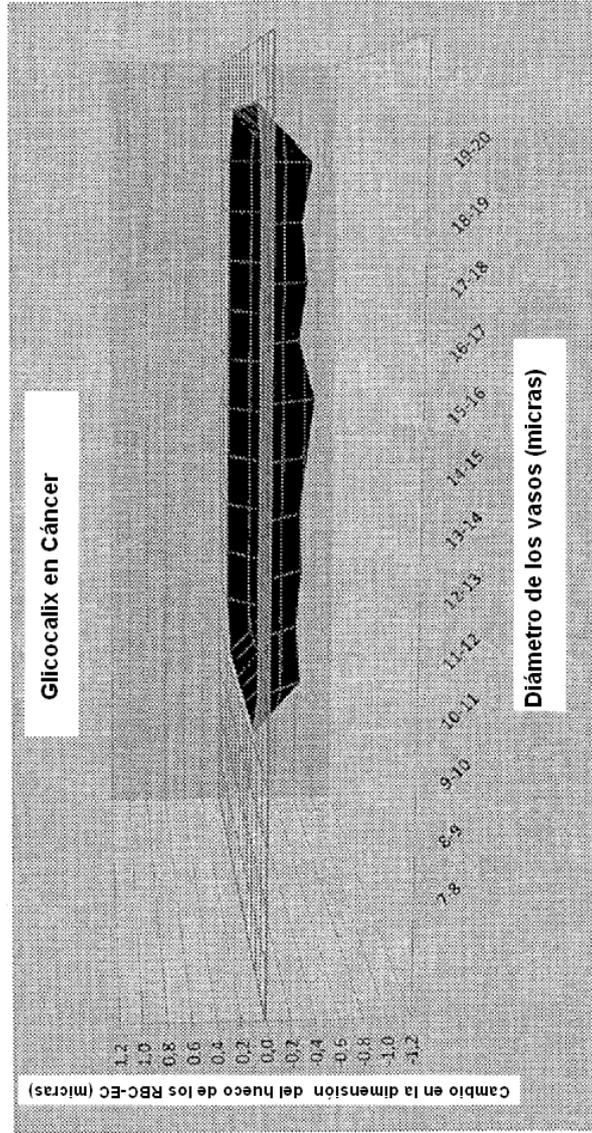
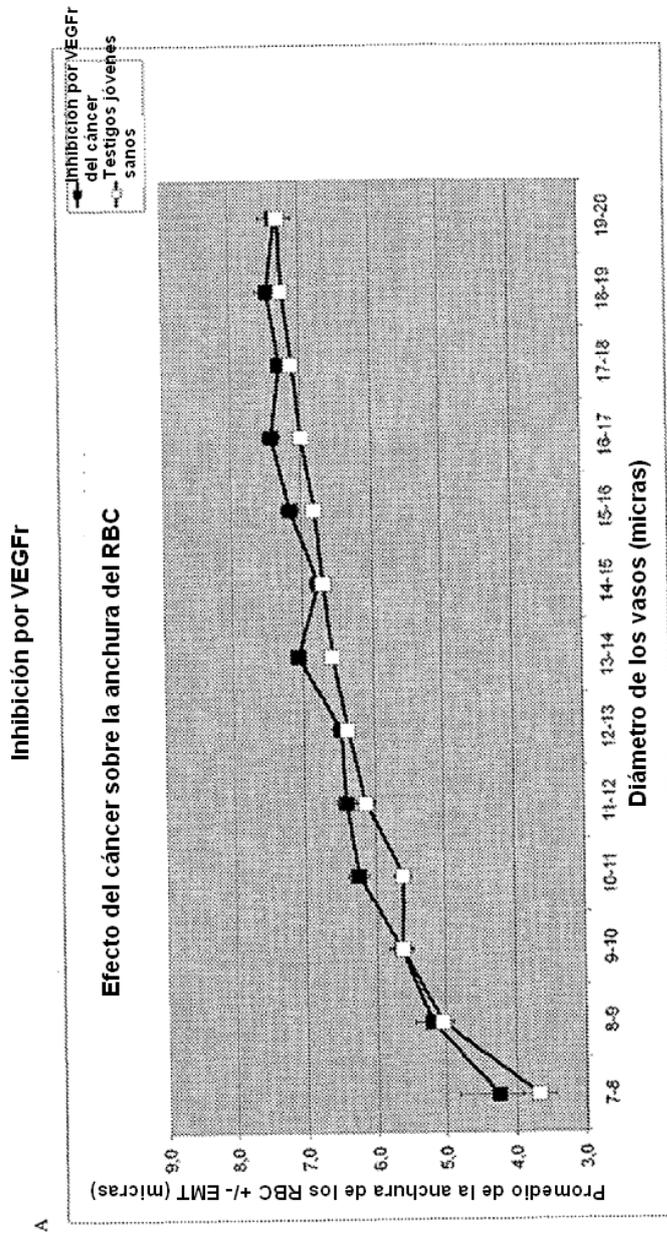
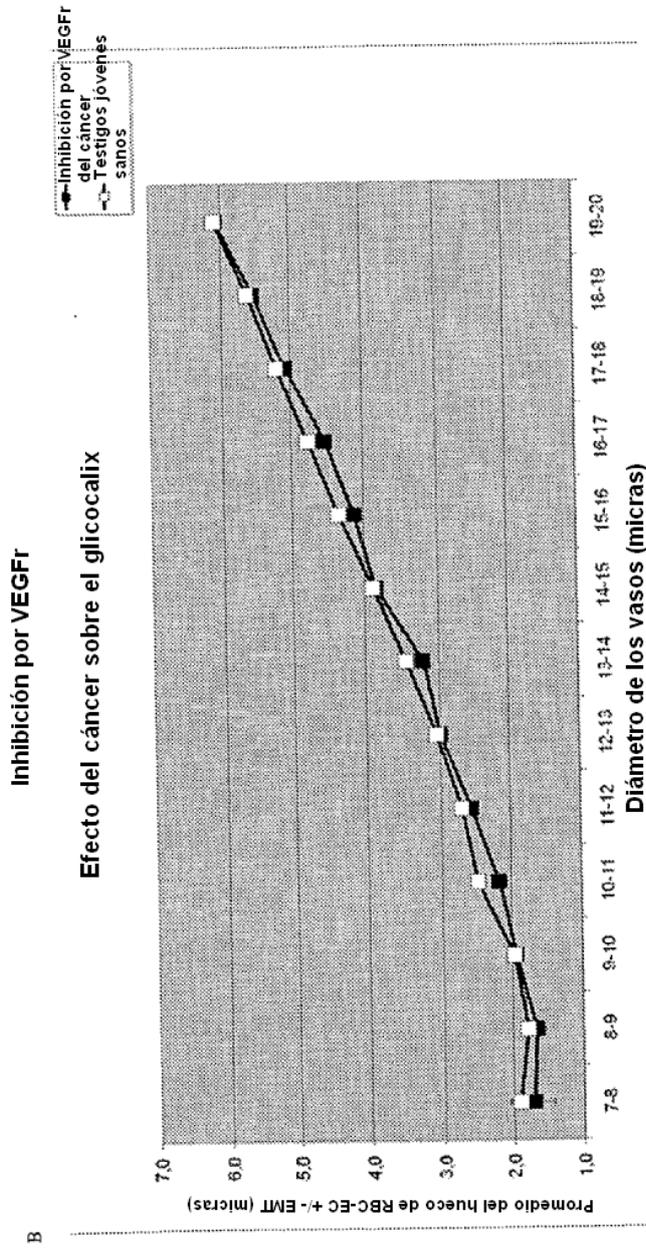


Figura 7



A



B

C

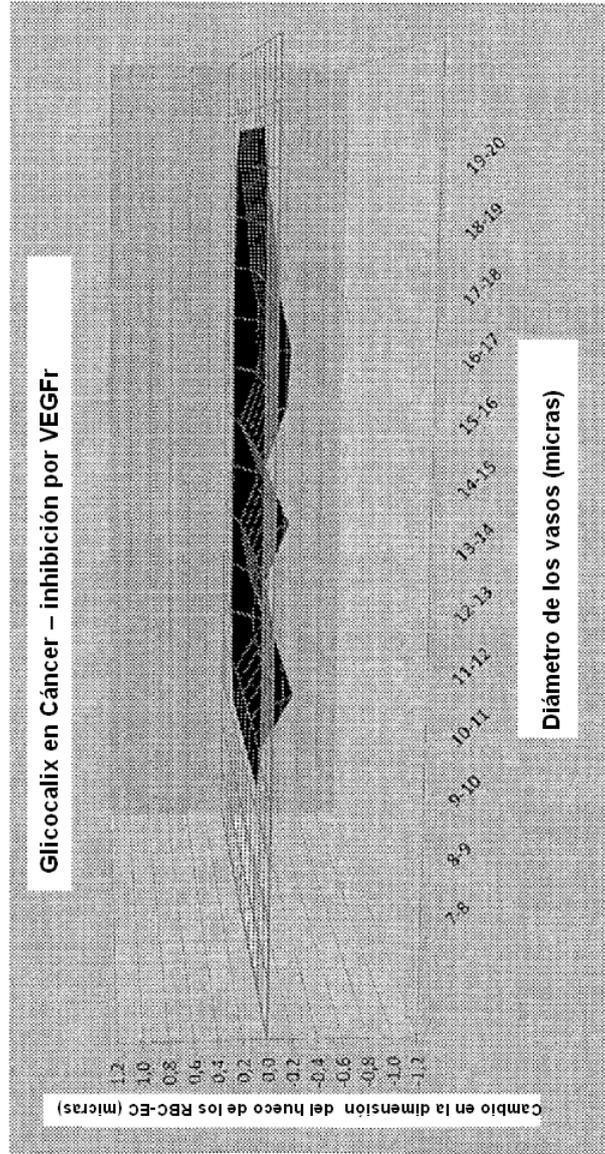
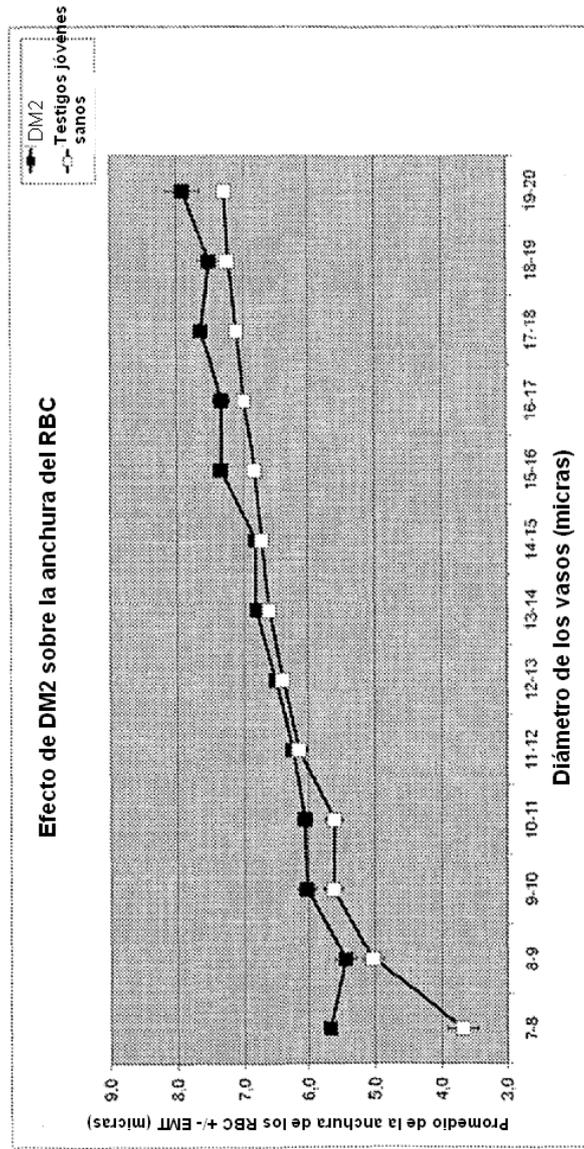
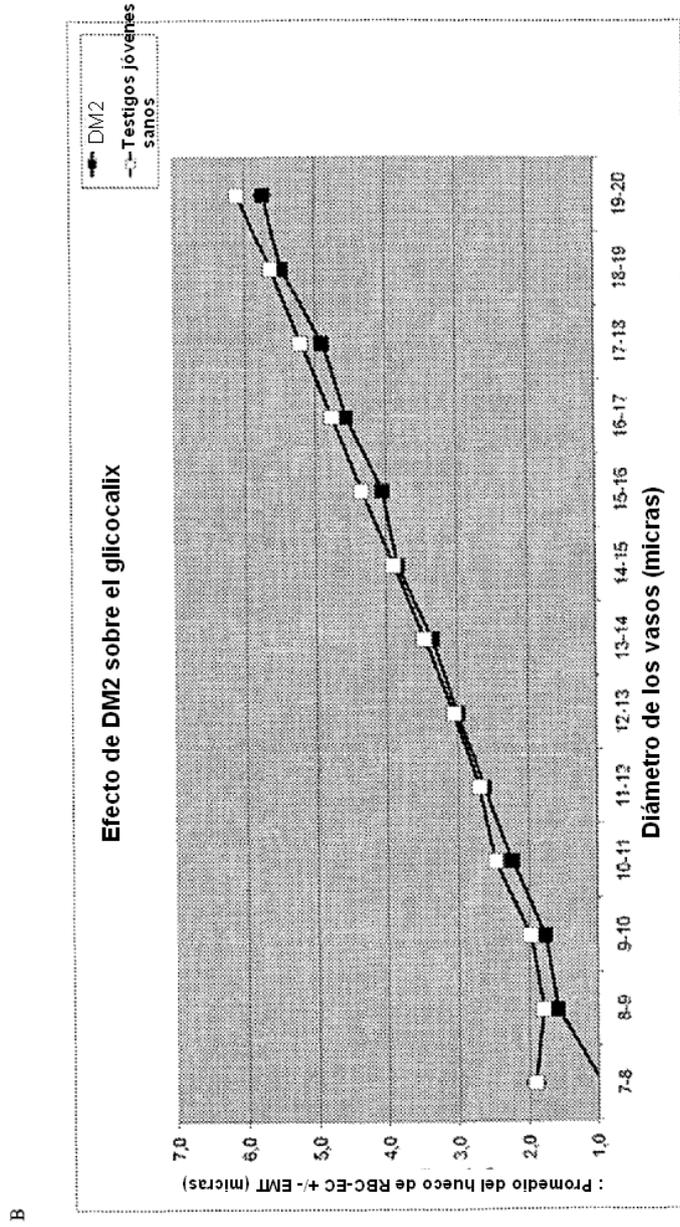


Figura 8

A





B

C

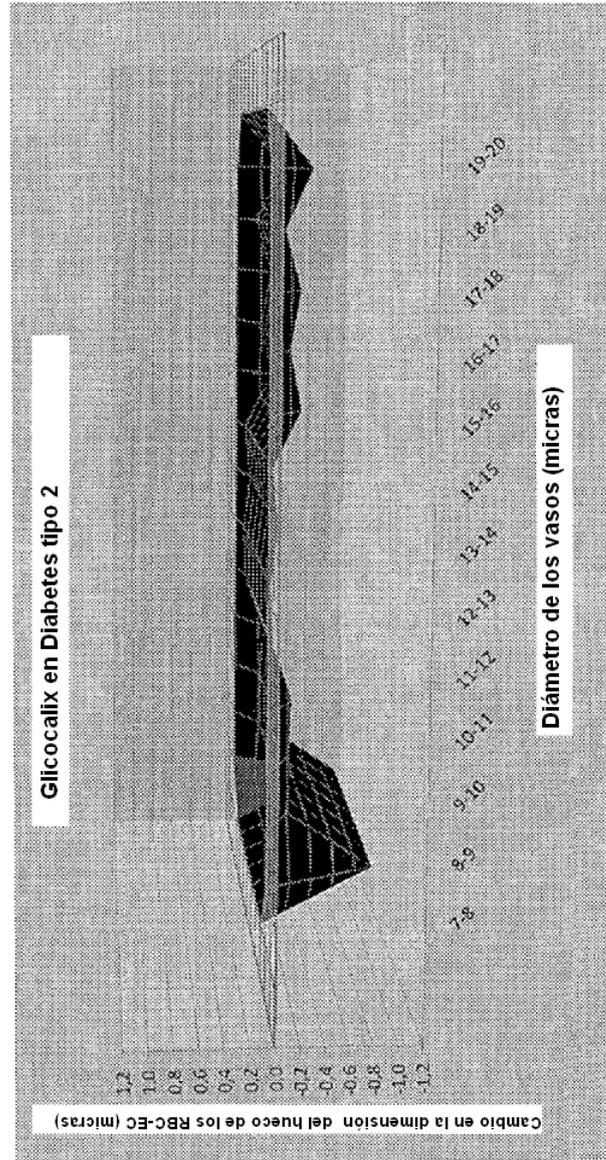
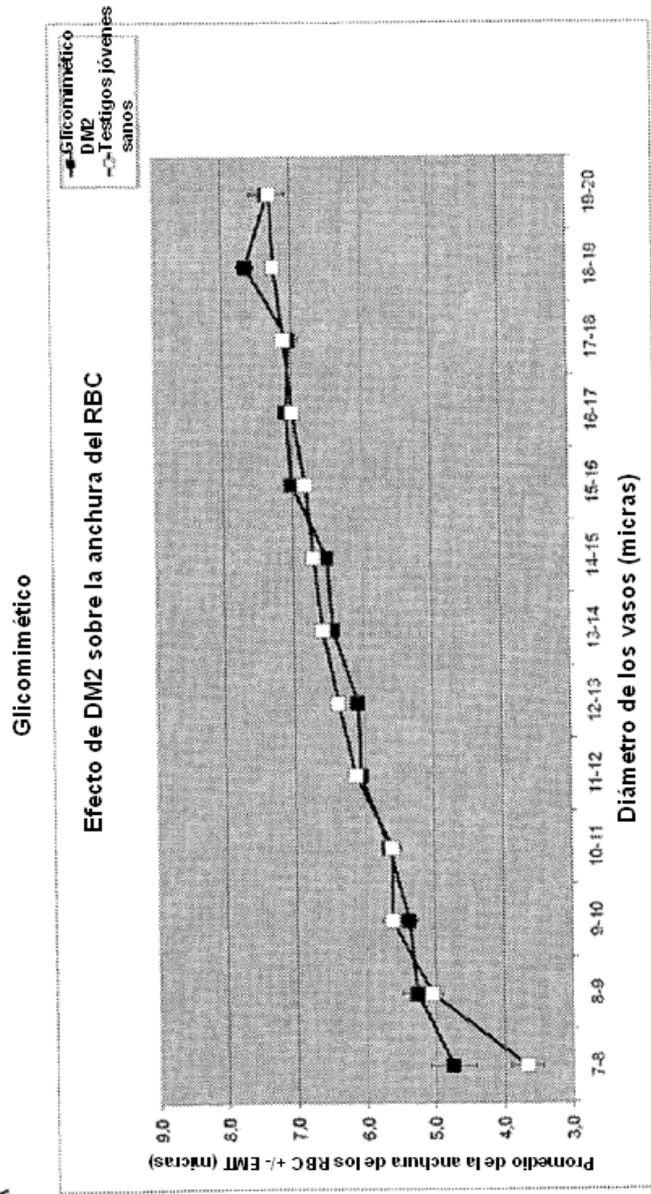
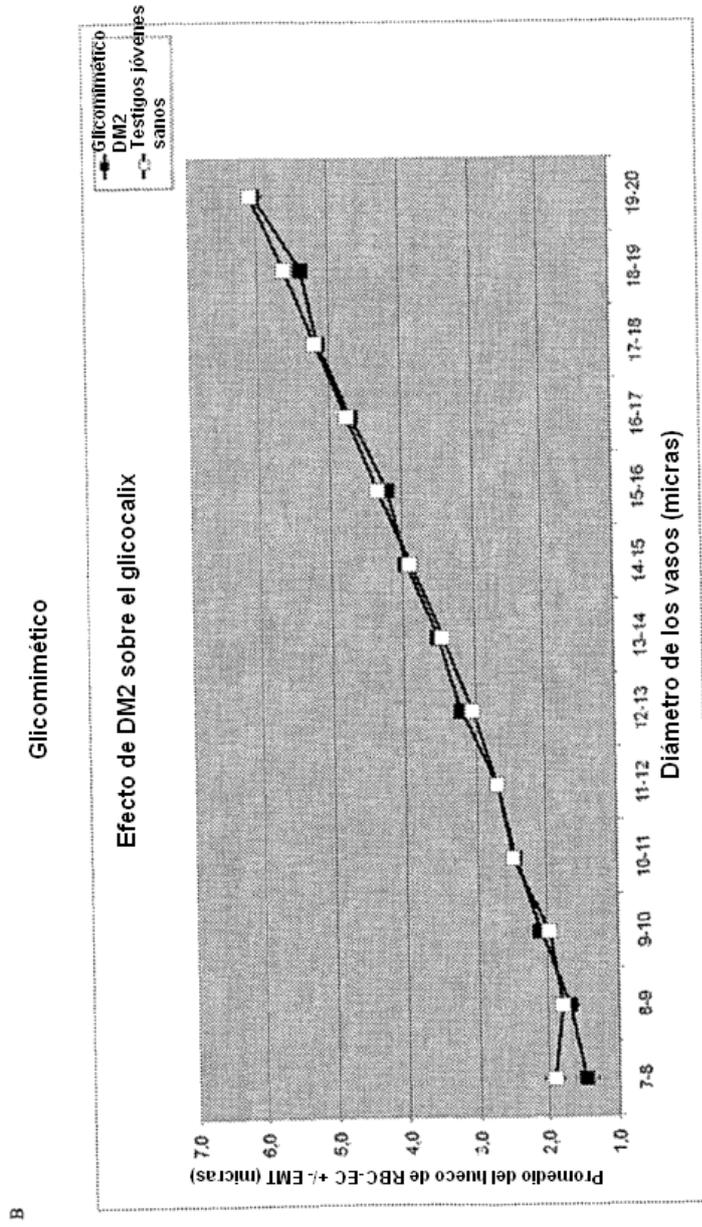


Figura 9

A





C

