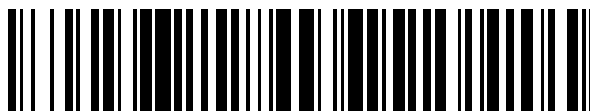


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 980**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2016 PCT/EP2016/058471**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166357**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2016 E 16721656 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3283889**

54 Título: **Procedimiento y ensayo de diagnóstico de la glomerulonefritis de progresión rápida en un sujeto**

30 Prioridad:

17.04.2015 GB 201506564

22.04.2015 US 201562151302 P

12.02.2016 EP 16155463

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.09.2020

73 Titular/es:

**EUROIMMUN MEDIZINISCHE
LABORDIAGNOSTIKA AG (50.0%)**

Seekamp 31

23560 Lübeck, DE y

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION
SCHOLARS, AND THE OTHER MEMBERS OF
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY &
UNDIV. TRINITY OF QUEEN ELIZABETH NEAR
DUBLIN (50.0%)**

72 Inventor/es:

LITTLE, MARK

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 781 980 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

Procedimiento y ensayo de diagnóstico de la glomerulonefritis de progresión rápida en un sujeto

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a determinar la presencia o ausencia de insuficiencia renal en un sujeto. De manera más específica, la invención se refiere a un procedimiento y ensayo de determinación de la presencia o la ausencia de recurrencia o brote de glomerulonefritis de progresión rápida (GNPR)/glomerulonefritis semilunar (GNS) en un individuo.

Antecedentes de la invención

- 10 La glomerulonefritis de progresión rápida (GNPR)/glomerulonefritis semilunar (GNS) causa insuficiencia renal debido a la formación de "media luna" glomerular. Estas "medias lunas", un sello distintivo de la lesión inflamatoria grave, son infiltrados de leucocitos inflamatorios (principalmente macrófagos) y células renales intrínsecas en proliferación. Las principales causas de la GNPR/GNS son la vasculitis de los vasos pequeños (normalmente, con anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos, ANCA [*Anti-Neutrophil Cytoplasm Antibodies*], o anticuerpos contra la membrana basal glomerular, GBM [*Glomerular Basement Membrane*]) y glomerulonefritis del complejo inmunitario (debida al lupus eritematoso sistémico, LES/nefropatía por lupus o IgA). Si no se tratan, producen una pérdida irreversible completa de la función renal. La glomerulonefritis es la segunda causa más frecuente de enfermedad renal terminal, que requiere tratamiento mediante diálisis permanente o trasplante.

- 20 En el mundo desarrollado, uno de cada cinco adultos y uno de cada tres niños experimentan un episodio de lesión renal aguda (LRA) durante un ingreso hospitalario, de los cuales aproximadamente el 5 % tendrá GNS. Aunque la mayoría de los episodios de LRA responden a medidas conservadoras, aquellos con GNS necesitan tratamiento específico urgente. Los niveles de CD163 soluble (sCD163) en la orina se han asociado con la identificación de LRA en pacientes con sepsis, pero los valores no fueron significativos, y este estudio se limitó al entorno de la unidad de cuidados intensivos (Longxiang Su y col. *BMC Nephrology*, 2012, 13: 123).

- 25 El diagnóstico de estas afecciones se ayuda de los biomarcadores serológicos bien establecidos y de la biopsia renal cuando es necesario. Sin embargo, existe una necesidad sin cubrir dentro de los elementos específicos de la atención clínica de estos pacientes. La mayoría de las formas de GNPR siguen un curso recurrente y remitente. En particular, en la vasculitis con ANCA y nefritis lúpica establecidas, el médico tratante se suele enfrentar a una decisión clínica al enfrentarse a síntomas inespecíficos y cambios en la función renal. En este entorno, los marcadores serológicos usados en el diagnóstico tienen una utilidad limitada, de modo que el médico debe basarse en la detección de sangre en la orina, proteínas y cilindros, en asociación con marcadores de la inflamación no específicos tales como la proteína c reactiva. Se suele requerir una biopsia de riñón, una investigación invasiva, costosa y potencialmente peligrosa.

- 35 La orientación personalizada de la intensidad de la terapia inmunosupresora usando un biomarcador que proporcione evidencia directa de activación de macrófagos glomerulares también se enfrenta a problemas similares. En la actualidad, el seguimiento del grado de inflamación y de destrucción glomerular en el transcurso de un tratamiento de inducción potencialmente tóxico se lleva a cabo usando un enfoque "uniforme", o usando las mejores conjeturas basadas en parámetros de orina y función renal excretora.

- Tsuboi y col. (Tsuboi, N. y col., 2014, *Arthritis & Rheumatology*, vol. 66, n.º supl. 10, página S727) desvelan que el nivel de sCD163 en orina tiene una posible importancia para la estimación de la actividad de la enfermedad en pacientes con nefritis lúpica (NL) humana.

- 40 Ying y col. (Ying, Z. y col., 2013, "Arthritis research and therapy", vol. 15, n.º 5, página R161) desvelan que el aumento de la expresión de LL37 y de interferón- α está asociado con la vasculitis asociada a los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA) humanos.

Es el objeto de la invención superar al menos uno de los problemas anteriormente referenciados.

Sumario de la invención

- 45 Es un objeto de la invención proporcionar una prueba sencilla no invasiva que distinga la glomerulonefritis activa de las que no lo son, tales como la lesión renal isquémica, nefritis intersticial, otra lesión renal *de novo* (por ejemplo, la deposición secundaria a la de paraproteínas) o la infección de orina, lo que sería valioso en la práctica clínica.

- 50 Una prueba de punto de atención no invasiva permitiría optimizar la duración del tratamiento, personalizar el tratamiento con el objetivo de reducir al mínimo la exposición innecesaria al tratamiento de inducción tóxica o garantizar la resolución completa de la inflamación antes de cambiar a la terapia de mantenimiento. El tratamiento de la GNS, en particular, cuando es causada por la vasculitis con ANCA o la enfermedad anti-GBM, normalmente comprende la inmunosupresión intensa con corticosteroides y aproximadamente 3 meses de ciclofosfamida o tratamiento con rituximab (un anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20, comercializado con los nombres comerciales Rituxan®, MabThera® y Zytux®). Los biomarcadores actuales que guían la intensidad de esta terapia incluyen la tira

reactiva de orina (para proteínas y sangre) y el nivel de creatinina en suero. Se ha informado que la obtención de resultados de hematuria con tira reactiva también requiere mucho tiempo y que su persistencia no predice el resultado final, mostrando aún un 40 % hematuria en el momento de cambiar a inmunosupresión de mantenimiento (Chen, T. K., y col., *Semin Arthritis Rheum*, 2014. 44(2): pág. 198-201). Estos hallazgos sugieren que en el punto de reducción de la inmunosupresión, en general, la función renal sigue mejorando con medidas convencionales. Por lo tanto, estas medidas no pueden considerarse directrices útiles para el momento de, por ejemplo, la interrupción de la terapia con ciclofosfamida.

De acuerdo con la invención, se proporciona, según lo establecido en las reivindicaciones adjuntas, un procedimiento de identificación de un individuo con glomerulonefritis semilunar (GNS) activa, comprendiendo el procedimiento la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia se correlaciona con el individuo que tiene GNS activa, en el que la muestra biológica es orina y la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos contra la membrana basal glomerular (anti-GBM).

En una realización, el procedimiento comprende además la etapa de analizar la muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, se correlaciona con el individuo que tiene GNS activa.

De acuerdo con la invención, se proporciona, según lo establecido en las reivindicaciones adjuntas, un procedimiento de evaluación de si un individuo debe continuar recibiendo tratamiento para la GNS, comprendiendo el procedimiento la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia se correlaciona con el individuo que es adecuado para la continuación del tratamiento, en el que la muestra biológica es orina y la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos contra la membrana basal glomerular (anti-GBM).

Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de analizar la muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, se correlaciona con que el individuo es adecuado para la continuación del tratamiento.

Preferentemente, el tratamiento que consiste en tratamiento con glucocorticoides y/o tratamiento inmunosupresor.

De acuerdo con la invención, se proporciona, según lo establecido en las reivindicaciones adjuntas, un procedimiento para distinguir el brote de GNS de otras causas de deterioro clínico en un individuo del que se sabe que tiene GNS o una enfermedad autoinmunitaria sistémica normalmente asociada con la GNS, comprendiendo el procedimiento la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia se correlaciona con el individuo que padece un brote de GNS y no otras causas de deterioro clínico, en el que la muestra biológica es orina y la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos contra la membrana basal glomerular (anti-GBM).

Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de analizar la muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con niveles elevados de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, se correlaciona con el individuo que padece un brote de GNS y no otras causas de deterioro clínico.

Preferentemente, las otras causas de deterioro clínico comprenden lesión renal isquémica, nefritis intersticial, deposición secundaria a la deposición de paraproteínas, toxicidad por fármacos, lesión tubular mioglobínica, malignidad, necrosis tubular aguda, infección de orina, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica o glomerulonefritis fibrilar.

Además, en el presente documento, se describe que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en orina, suero, sangre y biopsia renal.

Preferentemente, la muestra de referencia es un individuo identificado con enfermedad renal no causada por VVP, GNS activa aguda u otras formas de GNS.

Además, en el presente documento, se describe que el brote de GNS está causado por vasculitis de vasos pequeños

(con y sin la presencia de anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA)), enfermedad de anticuerpos contra la membrana basal glomerular (anti-GBM) y glomerulonefritis del complejo inmunitario, incluyendo lupus eritematoso sistémico-LES/lupus, crioglobulinemia, glomerulonefritis postinfecciosa, glomerulonefritis fibrilar, glomerulonefritis mesangiocapilar, glomerulopatía C3 o nefropatía por IgA.

5 En una realización, se proporciona, según lo establecido en las reivindicaciones adjuntas, terapia con glucocorticoides o inmunosupresora para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo con glomerulonefritis semilunar (GNS) establecida o recurrencia de GNS, comprendiendo el procedimiento las etapas de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, identificar al individuo para el tratamiento si la muestra biológica muestra un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, y tratar al individuo con una terapia de glucocorticoides y/o una terapia inmunosupresora, en el que la muestra biológica es orina, la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos contra la membrana basal glomerular (anti-GBM), el glucocorticoide se selecciona entre prednisolona, metil-prednisolona, hidrocortisona o dexametasona, y la terapia inmunosupresora se selecciona entre ciclofosfamida, rituximab, micofenolato de mofetilo, azatioprina o metotrexato.

Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, identificar al individuo para el tratamiento si la muestra biológica muestra un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, y tratar al individuo con una terapia de glucocorticoides y/o una terapia inmunosupresora.

Además, en el presente documento, se describe un sistema para llevar a cabo el procedimiento como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el sistema: un módulo de determinación; y un módulo de visualización; en el que el módulo de determinación está configurado para recibir al menos una muestra de prueba de un individuo y realizar al menos un análisis de prueba en la muestra de prueba para generar datos de sCD163 que indiquen los niveles de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia; y en el que el módulo de visualización muestra los niveles de sCD163.

El módulo de determinación está configurado para recibir al menos una muestra de prueba de un individuo y realizar al menos un análisis de prueba en la muestra de prueba para generar datos de MCP-1 y datos de sCD163 que indiquen los niveles de MCP-1 y de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia; y en el que el módulo de visualización muestra los niveles de MCP-1 y sCD163.

El sistema comprende además un dispositivo de almacenamiento, en el que el dispositivo de almacenamiento almacena los datos de sCD163 generados por el módulo de determinación. El sistema comprende además un dispositivo de almacenamiento, en el que el dispositivo de almacenamiento también almacena los datos de MCP-1 generados por el módulo de determinación.

El sistema comprende además un módulo de correlación, en el que el módulo de correlación identifica al individuo con GNS o que está padeciendo un brote de GNS si los datos de sCD163 de la muestra de prueba muestran un mayor nivel de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia. El módulo de correlación identifica al individuo con GNS o que está padeciendo un brote de GNS si los datos de sCD163 y de MCP-1 de la muestra de prueba muestran un mayor nivel de sCD163 y de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia.

En una realización, se proporciona, según lo establecido en las reivindicaciones adjuntas, un procedimiento que comprende tratar a un individuo con terapia de glucocorticoides y/o terapia inmunosupresora, en el que el individuo ha sido identificado previamente como un individuo que tiene GNS o que está padeciendo un brote de GNS en función de la presencia de un nivel elevado de sCD163 en una muestra biológica del individuo en comparación con los niveles en una muestra de referencia.

Preferentemente, el individuo ha sido identificado previamente como un individuo que tiene GNS o que está padeciendo un brote de GNS en función de la presencia de un nivel elevado de MCP-1 en una muestra biológica del individuo en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con un nivel elevado de sCD163 en la muestra biológica del individuo en comparación con los niveles en una muestra de referencia.

En una realización de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de análisis emplea un aparato de diagnóstico *in vitro* configurado para detectar un nivel elevado de un marcador seleccionado entre sCD163, y opcionalmente, MCP-1, en orina, y en la que el procedimiento comprende una etapa de análisis de la muestra biológica con el aparato de diagnóstico *in vitro*.

El aparato de diagnóstico *in vitro* comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un marcador de proteína seleccionado entre sCD163 y, opcionalmente, MCP-1 inmovilizado en un soporte, en el que el procedimiento comprende las etapas de poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en condiciones que permitan que se produzca una reacción de unión de proteína-anticuerpo o proteína-fragmento de anticuerpo inmuno-específica, y la detección de una reacción de unión de proteína-anticuerpo o proteína-

fragmento de anticuerpo inmunoespecífica.

El aparato de diagnóstico *in vitro* se selecciona entre un kit de ELISA y un kit de tira reactiva.

El aparato de diagnóstico *in vitro* es un kit de tira reactiva que comprende: una tira reactiva que tiene el anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a sCD163 y, opcionalmente, a MCP-1 inmovilizado encima; uno o más reactivos capaces de detectar la reacción de unión de proteína-anticuerpo o proteína-fragmento de anticuerpo inmunoespecífica y emitir una señal detectable; y un dispositivo de correlación para correlacionar la señal detectable con un nivel elevado de sCD163 y, opcionalmente, de MCP-1.

En el mejor de los casos, la señal detectable es un cambio de color, siendo el dispositivo de correlación una tabla de colores.

El solicitante sugiere que el nivel de sCD163 en la orina refleja la actividad de la GNS y, por lo tanto, proporciona un biomarcador específico tanto para el diagnóstico del brote de GNS como para el seguimiento de la respuesta glomerular al tratamiento de inducción (ajustando así el tratamiento correspondientemente).

El patrón de excreción de sCD163 en la orina a lo largo del tiempo en los pacientes tratados por GNPR podría determinarse usando el procedimiento de la invención y también usarse para evaluar los valores de excreción de sCD163 en orina en imitaciones de la GNPR, tales como la infección del tracto urinario y la nefritis tubulointersticial.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción de una realización de la misma, dada solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en la que:-

La **Figura 1** ilustra datos que respaldan el uso de sCD163 en orina como biomarcador de la vasculitis renal activa. A: Tinción inmunohistoquímica de tejido renal de un paciente con vasculitis renal. Los macrófagos portadores de CD163 se tiñen de marrón y están ubicados predominantemente dentro de un glomérulo lesionado (flecha roja, panel izquierdo), que se encuentra adyacente a un glomérulo no lesionado (flecha verde). El espacio urinario dentro de la cápsula de Bowman (flecha roja, panel derecho) se encuentra adyacente a un área de formación semilunar (óvalo rojo), permitiendo así el desprendimiento de CD163 directamente en la orina. B: Pruebas de sCD163 en orina como biomarcador de la vasculitis renal activa en dos cohortes de pacientes y controles. Cabe señalar que los valores están normalizados con respecto a la creatinina; los valores medidos reales estaban entre 1 y 30 ng/ml. La cohorte de inicio se usó para definir un nivel de corte óptimo de 0,33 ng/ml/mmol de creatinina. C: Pruebas en serie de sCD163 en orina a medida que los pacientes son tratados y entran en remisión. Los niveles caen rápidamente y permanecen bajos en dos puntos de tiempo de remisión.

La **Figura 2** ilustra las curvas de Kaplan Meier que representan el tiempo para alcanzar el nadir de creatinina y de la proporción de proteína:creatinina (PPC) en orina. Las líneas de puntos indican un intervalo de confianza del 95 %.

La **Figura 3** ilustra que CD163 está presente en la orina y los riñones de ratas con vasculitis autoinmunitaria experimental (VAE). **A.** Se recogió orina de ratas sanas de control (n = 3) y ratas a los 28 días (n = 5), 56 días (n = 6) y 186 días (n = 3) después de la inducción de la VAE. Los niveles de sCD163 se determinaron mediante ELISA. Los datos se presentan como la media de sCD163 (ng/mmol) ± error típico de la media. Se usaron la ANOVA unidireccional y la prueba de comparación múltiple de Dunn para probar la tendencia lineal (*p < 0,05). **B,C,E,F,G,I,J,K.** Imágenes confocales de glomérulos de ratas con VAE de doble tinción con anticuerpos contra el marcador de macrófagos CD68 (C, F, G, verde) y CD163 (rojo). Los paneles B y C representan imágenes representativas de tejido teñido con control de isotipo y anticuerpo de prueba respectivamente. La línea blanca indica la cápsula de Bowman, mientras que la línea amarilla fina del panel C indica una media luna glomerular (flecha blanca). Los paneles E y F muestran imágenes confocales en los canales de CD163 y CD68 respectivamente, mientras que el panel G muestra la imagen fusionada. Aunque la mayoría de las células son positivas solo para uno de los marcadores, las células también se identifican con tinción doble (flecha amarilla). El panel I muestra doble tinción con CD163 (flecha amarilla) y CCR7 (verde); no hubo ubicación conjunta entre los 2 marcadores, siendo CCR7 expresado con la mayor fuerza en los vasos sanguíneos pequeños (flecha blanca). Los paneles J y K muestran tinción con CD163 y CD206 (verde), mostrando la ubicación conjunta en el panel J (flecha) y la falta de ubicación conjunta en el panel K (flecha). **D,H.** Usando cortes de riñón de 5 µM de ratas con VAE y ratas de control, se realizó el recuento de células positivas para CD68, CD163 o ambos marcadores, con enmascaramiento, en 30 glomérulos consecutivos (**D**) y 10 campos de 40 aumentos que solo contenían compartimento tubulointersticial (**H**), (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). **L.** El número medio de células por campo de alta potencia (cap) en ratas con VAE se correlacionó con el nivel de sCD163 en orina en el mismo animal.

La **Figura 4** ilustra que CD163 se expresa a un alto nivel en los riñones de pacientes con vasculitis. A. Se extrajo ARN de compartimientos glomerulares y tubulointersticiales microdisccionados de pacientes con nefropatía diabética (ND), enfermedad de cambio mínimo (ECM), nefropatía por IgA (IgA), glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), glomerulonefritis membranosa (GNM), nefritis lúpica (LES) y vasculitis con ANCA. Se determinó el grado de expresión del gen CD163 en comparación con el riñón de control sano microdisccionado mediante micromatrices de Affymetrix. Las barras representan el factor de cambio en comparación con los respectivos controles (DV). (****q < 0,01 %, * q < 5 %) **B.** Se tiñeron cortes de riñón humano embebido en parafina

de pacientes con vasculitis para la proteína CD163 mediante inmunohistoquímica y se calificaron con enmascaramiento según la ubicación de las células en cada una de las 5 regiones: (1) dentro de regiones de necrosis fibrinoide o formación semilunar, (2) dentro de regiones de glomérulos aparentemente normales, (3) en la región peri-glomerular, (4) dentro de los túbulos; y (5) en el compartimento intersticial. C. Puntuaciones de CD163 en cada una de las 5 regiones respectivas estratificadas por diagnóstico clínico (gráficos superiores) y especificidad de anticuerpos (gráficos inferiores), ($p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). **D-I.** Las imágenes representan vistas representativas de baja potencia (de 40 aumentos) del riñón de control sano (D) y riñón vasculítico (E), junto con vistas de alta potencia (de 400 aumentos) del riñón de control sano (F), un glomérulo con lesión vasculítica leve (G, flecha), un glomérulo afectado gravemente con formación semilunar establecida (H, flecha) y un glomérulo con una media luna fibrosa de una lesión vasculítica previa (I, flecha, 200 aumentos).

La **Figura 5** ilustra que sCD163 es elevado en la orina de aquellos con vasculitis renal activa, pero no con vasculitis extrarrenal activa. Los niveles de sCD163 se midieron mediante ELISA en una cohorte inicial ($n = 177$) (**A**) y dos cohortes de validación ($n = 155 + 133$) (**B,C**). Los gráficos muestran la comparación de los niveles encontrados en la vasculitis renal activa, vasculitis extrarrenal activa, vasculitis renal en remisión (Rem) y vasculitis extrarrenal en remisión. Los datos se presentan como la mediana del nivel de sCD163 en ng/mmol de creatinina con intervalo intercuartil. Los recuadros en B y C indican la fracción de muestras positivas de cada grupo usando el límite óptimo de 0,3 ng/mmol. Se usaron la prueba ANOVA unidireccional no paramétrica (prueba de Kruskal-wallis) y la prueba de comparación múltiple de Dunn para evaluar la importancia de cada grupo en comparación con el grupo de vasculitis renal activa ($**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$). **D.** Curvas de eficacia diagnóstica (ROC, *Receiver Operator Curves*) calculadas a partir de datos normalizados (línea continua) y no normalizados (línea discontinua) derivados de la cohorte inicial que representa la capacidad de sCD163 para detectar la vasculitis renal activa. Las respectivas áreas debajo de las curvas fueron de 0,94 y 0,96 respectivamente. **E.** sCD163 se midió mediante ELISA en muestras en serie durante períodos de enfermedad activa, actividad baja de la enfermedad (ABE) y remisión (Rem). Los gráficos muestran los niveles de sCD163 a lo largo del tiempo en pacientes con vasculitis renal y extrarrenal. Las líneas representan muestras del mismo sujeto en diferentes puntos de tiempo.

La **Figura 6** ilustra que sCD163 está elevado en la orina de pacientes con vasculitis renal activa, y se compara con una variedad de grupos de control. (**A**) Los datos de las cohortes de inicio y validación ($n = 465$) se combinaron y compararon con controles sanos ($n = 55$) y un grupo diverso de control con enfermedad que comprende muestras de pacientes en la unidad de cuidados intensivos con sepsis con o sin lesión renal aguda (LRA) ($n = 32$), LRA sin sepsis ($n = 286$) y sin LRA o sepsis ($n = 463$), además de un grupo de control con enfermedad no en UCI con ($n = 30$) y sin ($n = 54$) glomerulonefritis no vasculítica (GN). Los recuadros se refieren a la fracción de casos con un nivel de sCD163 en orina $>0,3$ ng/mmol (línea de puntos). (**B**) los niveles de sCD163 también se midieron mediante ELISA en una cohorte de validación externa independiente ($n = 52$). Gráfico que muestra la comparación de los niveles encontrados en la vasculitis renal activa (Act), vasculitis extrarrenal activa, vasculitis renal en remisión (Rem) y controles sanos. Los datos se presentan como la mediana del nivel de sCD163 en ng/mmol de creatinina con intervalo intercuartil. Se usaron la prueba ANOVA unidireccional no paramétrica (prueba de Kruskal-wallis) y la prueba de comparación múltiple de Dunn para evaluar la importancia de cada grupo en comparación con el grupo de vasculitis renal activa ($***p < 0,001$, $****p < 0,0001$).

La **Figura 7** ilustra que sCD163 es estable en la orina a través de un intervalo de temperaturas y que la orina que es positiva en sangre según la tira reactiva de orina es negativa en sCD163 en orina. A. Se almacenaron seis muestras de nivel conocido de sCD163 durante 24 y 168 horas (una semana) a temperatura ambiente, 4 °C y -20 °C. Se representó frente al tiempo el % de cambio en el nivel de sCD163 de las muestras almacenadas en paralelo a -80 °C; media $\pm$ ETM. B. Se sometieron las muestras a entre 1 y 6 ciclos de congelación-descongelación, y se determinó el nivel de sCD163 mediante ELISA; media $\pm$ ETM. C. Se añadieron a la orina de control sano diluciones en serie de sangre, y se determinó el nivel de sCD163 mediante ELISA. Los símbolos + indican aquellas diluciones en las que la orina apareció macroscópicamente manchada de sangre. La línea de puntos indica el límite superior de lo normal según lo determinado en la cohorte de inicio.

La **Figura 8** ilustra que los niveles de sCD163 no están elevados en la sangre de pacientes con vasculitis sistémica. A. Se determinaron los niveles de sCD163 en suero mediante ELISA, y se compararon los niveles entre pacientes con enfermedad activa y en remisión, así como los controles con enfermedad (CE) y los controles sanos (CS). Los datos se presentan como la mediana de sCD163 en ng/ml con intervalo intercuartil. Se usaron la prueba ANOVA unidireccional no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) y la prueba de comparación múltiple de Dunn para evaluar la importancia de cada grupo en comparación con el grupo de vasculitis activa. B. También se determinaron los niveles de sCD163 en orina mediante ELISA y el grado de correlación entre los niveles en suero y en orina mediante la prueba de Spearman ($n = 337$).

La **Figura 9** ilustra que los niveles de sCD163 en orina se correlacionan con la tinción glomerular de CD163, pero no con la tinción extraglomerular. (A) Se tiñó el tejido renal para CD163 y se definieron áreas separadas para los glomérulos (rojo), glomérulos obsoletos (verde) y tejido extraglomerular (azul). (B) Se configuró el software de análisis de visión para diferenciar entre núcleos rodeados por tinción con DAB (amarillo) y células sin tinción con DAB (verde). Después, se correlacionó el nivel de sCD163 en orina normalizado con la fracción de células teñidas para CD163 en los compartimientos glomerular (C) y extraglomerular (D). $***p < 0,005$

La **Figura 10** ilustra que los niveles de sCD163 en orina no son diferentes entre los pacientes positivos en MPO-ANCA ($n = 36$ activa, 113 en remisión) y PR3-ANCA ($n = 25$ activa, 190 en remisión). Los niveles de sCD163 en orina, según lo determinado mediante ELISA y normalizados con respecto a la creatinina en orina, fueron estratificados según la especificidad con ANCA.

La **Figura 11** es un diagrama de flujo que ilustra los módulos funcionales del sistema de la invención reivindicada.

Descripción detallada de los dibujos

La invención se refiere a procedimientos de identificación de individuos que probablemente tengan glomerulonefritis semilunar (GNS) en la lesión renal aguda (LRA) indiferenciada, o que tengan recurrencia de GNS, o a procedimientos de identificación de individuos que necesiten tratamiento para un brote de GNS o GNS. La identificación de dichos individuos es útil, ya que permite al médico determinar si un individuo que presenta LRA tiene GNS en lugar de mieloma múltiple, síndrome urémico hemolítico, necrosis tubular aguda u otra causa de reducción de la función renal. Estos procedimientos acelerarán este procedimiento de diagnóstico y ayudarán a evitar la necesidad de una biopsia renal. También, también identifica si las personas con, por ejemplo, vasculitis con ANCA o nefritis lúpica padecen una recaída renal (brote de GNS), lo que, de lo contrario, requeriría una biopsia renal. La invención también se refiere a un procedimiento de rastreo de la inflamación glomerular en un individuo que esté siendo tratado por GNS, con miras a orientar cuándo se puede detener el tratamiento. Los procedimientos estiman la actividad de la enfermedad en el transcurso del tratamiento inmunosupresor (inducción) para la GNS, permitiendo así una decisión clínica racional sobre cuándo reducir la terapia.

Definiciones

En la memoria descriptiva, la expresión "lesión renal aguda" debe entenderse como una disminución de la tasa de filtración glomerular durante un período de horas o días. Es la pérdida brusca de la función renal, que produce la retención de urea y otros productos de desecho nitrogenados y la desregulación del volumen extracelular y de los electrolitos.

En la memoria descriptiva, la expresión "daño renal agudo (adquirido en la comunidad) indiferenciado" debe entenderse como daño renal agudo adquirido fuera del hospital con causa desconocida.

En la memoria descriptiva, la expresión "glomerulonefritis semilunar (GNS)", "glomerulonefritis de progresión rápida (GNPR)" y "brote de GNS" deben entenderse como la inflamación glomerular grave que produce la destrucción del mechón glomerular y la acumulación de células inflamatorias alrededor del mechón en forma de media luna. El brote de GNS indica la recurrencia de GNS tras un período de tiempo en un individuo que se sabe que tiene GNS previa o una enfermedad autoinmunitaria sistémica (tal como vasculitis con ANCA o LES) en el que se puede esperar la GNS como parte de la enfermedad. Las expresiones "glomerulonefritis semilunar (GNS)" y "glomerulonefritis de progresión rápida (GNPR)" pueden usarse indistintamente.

En la memoria descriptiva, la expresión "vasculitis de vasos pequeños (VVP)" debe entenderse como una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la destrucción de los vasos sanguíneos pequeños, con daño resultante en el órgano o tejido abastecido por ese vaso.

En la memoria descriptiva, la expresión "vasculitis aguda" debe entenderse como vasculitis que está activa en ese momento, es decir, hay una inflamación aguda presente en la región de la pared de los vasos sanguíneos, asociada con la evidencia de disfunción orgánica.

En la memoria descriptiva, la expresión "vasculitis con ANCA" debe entenderse como vasculitis de vasos pequeños (VVP) en el contexto de los anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA).

En la memoria descriptiva, la expresión "imitaciones de la GNS" debe entenderse como otras afecciones que tienen características clínicas similares a las de la GNS, tales como la lesión renal isquémica, nefritis intersticial, deposición secundaria a la deposición de paraproteínas, toxicidad por fármacos, lesión tubular mioglobinúrica, malignidad, necrosis tubular aguda, infección de orina, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica o glomerulonefritis fibrilar.

En la memoria descriptiva, la expresión "enfermedad anti-GBM" debe entenderse como vasculitis de vasos pequeños (VVP) en el contexto de los anticuerpos contra la membrana basal glomerular (GBM).

En la memoria descriptiva, la expresión "controles con enfermedad" debe entenderse como individuos con enfermedad renal que no se debe a la vasculitis de vasos pequeños (VVP), imitaciones de la GNS, GNS activa aguda u otras formas de GNS.

En la memoria descriptiva, la expresión "grupo de control sano" debe entenderse como individuos sin enfermedad renal u otra enfermedad importante conocida. En general, se considera que el nivel normal de sCD163 en un grupo de control sano es 2 DT por encima y por debajo de la media.

En la memoria descriptiva, la expresión "CD163 soluble (sCD163)" debe entenderse como la forma soluble (desprendida) de CD163, una molécula transmembrana sobre la superficie de los macrófagos activados, el tipo de célula que se encuentra con mayor frecuencia en las medias lunas glomerulares. CD163 se considera tradicionalmente un marcador de los macrófagos M2c. Esta proteína ha sido reconocida en muchos estudios como un marcador de la activación de los macrófagos, y recientemente se ha informado que los macrófagos que expresan factores de transcripción M1 (pSTAT1/RBP-J) también expresan frecuentemente CD163. De hecho, en condiciones polarizadas por TH1 caracterizadas por la expansión de los macrófagos M1, las células que expresan CD163 siguen siendo las

más frecuentes. CD163 se expresa en lesiones de nefropatía grave por IgA, glomerulonefritis membranoproliferativa y nefritis lúpica. Un estudio reciente sobre la nefritis lúpica demostró que > 70 % de los macrófagos glomerulares CD68+ fueron CD163+, y que los niveles de CD163 en orina se correlacionaron con la expresión glomerular de CD163. Los niveles de sCD163 en orina también se han asociado con la identificación de LRA en pacientes con sepsis, pero los valores no fueron significativos (Su y col. *BMC Nephrology*, 2012, 13:123). CD163 no se expresa en glomérulos humanos normales, en la enfermedad renal no inflamatoria (tal como el mieloma renal), y la expresión se limita al espacio tubulointersticial en la nefritis intersticial. A continuación, se proporcionan la secuencia de oligonucleótidos del gen sCD163 (SEQ ID NO: 1), el ARNm que codifica la proteína (SEQ ID NO: variantes 2, 3, 4 y 5), y la proteína (SEQ ID NO: 6). Debe entenderse que una cualquiera o todas las SEQ ID NO: 1 a 6 pueden detectarse en la muestra obtenida de un paciente.

SEQ ID NO: 1 - ADN: NC 000012.12 (7470816..7503818)

```

atatgtagcc ttttcatttt catgaaagtg aagtgatttt tagaattcctt agttgttttc
tttagaagaa catttctagg gaataatata agaagattta ggaatcattg aagttataaa
tctttggaat gagcaaactc agaatggtgc tacttgaaga ctctggatct gctgacttca
gaagacattt tgtcaacttg agtcccttca ccattactgt ggtcttactt ctcagtgcct
gttttgtcac cagttctctt ggaggaacag acaaggagct gaggctagtg gatggtgaaa
acaagtgtag cgggagagtg gaagtgaag tccaggagga gtggggaacg gtgtgtaata
atggctggag catggaagcg gtctctgtga tttgtaacca gctgggatgt ccaactgcta
tcaaagcccc tggatgggct aattccagtg caggttcttg acgcatttgg atggatcatg
tttcttgctg tgggaatgag tcagctcttt gggattgcaa acatgatgga tggggaaaagc
atagtaactg tactcaccaa caagatgctg gagtgccttg ctcatgatgga tccaatttgg
aaatgaggct gacgcgtgga ggaatatgt gttctggaag aatagagatc aaattccaag
gacggtgggg aacagtgtgt gatgataact tcaacataga tcatgcatct gtcatttgta
gacaacttga atgtggaagt gctgtcagtt tctctggttc atctaatttt ggagaaggct
ctggaccaat ctggtttgat gatcttataat gcaacggaaa tgagtcagct ctctggaact
gcaaacatca aggatgggga aagcataact gtgatcatgc tgaggatgct ggagtgattt
gctcaaaggg agcagatctg agcctgagac tggtagatgg agtcaactgaa tggtcaggaa
gattagaagt gagattccaa ggagaatggg ggacaatatg tgatgacggc tgggacagtt
acgatgctgc tgtggcatgc aagcaactgg gatgtccaac tgccgtcaca gccattggtc
gagttaacgc cagtaaggga tttggacaca tctggcttga cagcgtttct tgccaggggac
atgaacctgc tatctggcaa tgtaaacc accatgaatggg aaagcattat tgcaatcaca
atgaagatgc tggcgtgaca tgttctgatg gatcagatct ggagctaaga cttagagggtg
gaggcagccg ctgtgctggg acagttgagg tggagattca gagactgtta ggggaagggtg

```

ES 2 781 980 T3

```

gtgacagagg ctgggggactg aaagaagctg atgtgggtttg caggcagctg ggatgtggat
ctgcactcaa aacatcttat caagtgtact ccaaaatcca ggcaacaaac acatggctgt
ttctaagtag ctgtaacgga aatgaaactt ctctttggga ctgcaagaac tggcaatggg
gtggacttac ctgtgatcac tatgaagaag ccaaaattac ctgctcagcc cacagggaac
ccagactggg tggaggggac attccctggt ctggacgtgt tgaagtgaag catggtgaca
cgtggggctc catctgtgat tgggacttct ctctggaagc tgccagcggt ctatgcaggg
aattacagtg tggcacagt gtctctatcc tggggggagc tcactttgga gagggaaatg
gacagatctg ggctgaagaa ttccagtgtg agggacatga gtcccatctt tcactctgcc
cagtagcacc ccgcccagaa ggaacttgta gccacagcag ggatgttgga gtagtctgct
caagatacac agaaattcgc ttggtgaatg gcaagacccc gtgtgagggc agagtggagc
tcaaaacgct tgggtgcctgg ggatccctct gtaactctca ctggggacata gaagatgcc
atgttctttg ccagcagctt aaatgtggag ttgccctttc taccacagga ggagcagctt
ttggaaaagg aaatggtcag atctggaggc atatgtttca ctgcactggg actgagcagc
acatgggaga ttgtcctgta actgctctag gtgcttcatt atgtccttca gagcaagtgg
cctctgtaat ctgctcagga aaccagtcct aaacactgtc ctgctgcaat tcactgctct
tgggccccac aaggcctacc attccagaag aaagtgtgtg ggcctgcata gagagtgggc
aacttcgcct ggtaaatgga ggaggtcgct gtgctgggag agtagagatc tatcatgagg
gtcctctggg caccatctgt gatgacagct gggacctgag tgatgccac gtggtttgca
gacagctggg ctgtggagag gccattaatg ccactggttc tgctcathtt gggaaggaa
caggggccat ctggctggat gagatgaaat gcaatggaaa agaatcccgc atttggcagt
gccattcaca cggctggggg cagcaaaatt gcaggcaca ggaggatgcg ggagtatatc
gtcagaatt catgtctctg agactgacca gtgaagccag cagagaggcc tgtgcagggc
gtctggaagt tttttacaat ggagcttggg gcactgttgg caagagtagc atgtctgaaa
ccactgtggg tgtggtgtgc aggcagctgg gctgtgcaga caaagggaaa atcaacctg
catctttaga caaggccatg tccattccca tgtgggtgga caatgttcag tgtccaaaag
gacctgacac gctgtggcag tgcccatcat ctccatggga gaagagactg gccagcccct
cggaggagac ctggatcaca tgtgacaaca agataagact tcaggaaggaa cccacttctt
gttctggacg tgtggagatc tggcatggag gttcctgggg gacagtgtgt gatgactctt
gggacttggg cgtgctcag gtggtgtgtc aacaacttgg ctgtggtcca gctttgaaag
cattcaaaga agcagagttt ggtcagggga ctggaccgat atggctcaat gaagtgaagt
gcaaagggaa tgagtcttcc ttgtgggatt gtccctgccag acgctggggc catagttagt
gtgggcacaa ggaagacgct gcagtgaatt gcacagatat ttcagtgcag aaaaccccac
aaaaagccac aacaggtcgc tcatcccgtc agtcactcct tattgcagtc gggatccttg
gggttgttct gttggccatt ttcgtcgcac tattcttctt gactaaaaag cgaagacaga
gacagcggct tgcagtttcc tcaagaggag agaacttagt ccaccaaatt caataccggg
agatgaattc ttgcctgaat gcagatgac tggacctaata gaattcctca gaaaattccc
atgagtcagc tgatttcagt gctgctgaac taatttctgt gtctaaattt ctctctattt
ctggaatgga aaaggaggcc attctgagcc aactgaaaa ggaaaatggg aatttataac
ccagtgagtt cagcctttaa gataccttga tgaagacctg gactattgaa tggagcagaa
attcacctct ctactgact attacagttg cttttttatg gagtcttctt tctcctagga
ttcctaagac tgcctgtgaa ttataaaaa ttaagtttgt gaatgtgact acttagtggt
gtatatgaga ctttcaaggg aattaaataa ataaataaga atgttattga tttgagtttg
ctttaattac ttgtccttaa ttctattaat ttctaaatgg gcttccaat tttttgtaga
gtttcctaga tgtattataa tgtgttttat ttgacagtgt ttcaatttgc atatacagta
ctgtatatatt tttcttattt ggtttgaata attttctat taccaaataa aaataaattt
atttttactt tagtttttct aagacaggaa aggttaatga tattgaaggg tctgtaataa
atatatggct aactttataa ggcagtactc acaacgattc tttaactgct ttttgttact
gtaattctgt tcactagaat aaaatgcaga gccacacctg gtgagggcac

```

SEQ ID NO: 2 - ARNm (NM_004244.5) isoformas: Q86VB7-1 Q86VB7-2 Q86VB7-3 Q86VB7-4
 Isoforma 1 Q86VB7 secuencia de aminoácidos:

MSKLRMVLLLEDSSGADFRRHFNLSPTTITVLLLLSACFVTSSSLGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQE
EWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHSN
CTHQQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSG
SSNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSRLVDGVTECSGRLE
VRFQGEWGTICDDGWDSDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHAPAIWQCKHHEW
GKHYCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRGAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVCRQLGCGSAL
KTSYQVYSKIQATNTWFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGLTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGR

VEVKHGDWTWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEENGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVA
PRPEGTCSHSRDVGVCVCSRYTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL
STPGGARFGKNGQIWRHMFHCTGTQHMGCPTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGF
TRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSGWTICDDSWDLSDAHVVCRQLGCGEAINATG
SAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLE
VFYNGAWGTVGKSSMSETTVGVVCRQLGCADKGINPASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPW
EKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSGWTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFF
EAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDAANCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSS
FIAVGILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDLDMNSSSENSHES
ADFSAAELISVSKFLPISGMEKEAILSHTEKENGNL

SEQ ID NO: 3 Isoforma 2 (identificador: Q86VB7-2). También conocida como: Variante 2 de cola larga

La secuencia de aminoácidos de esta isoforma difiere de la secuencia canónica en lo siguiente:

1115-1156: ENSHESADFS...SHTEKENGNL → GLWVLGGSIA...GSLDAYNGQE

MSKLRMVLLLEDSSGADFRRHFNLSPTTITVLLLLSACFVTSSSLGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQE
EWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHSN
CTHQQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSG
SSNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSRLVDGVTECSGRLE
VRFQGEWGTICDDGWDSDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHAPAIWQCKHHEW
GKHYCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRGAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVCRQLGCGSAL
KTSYQVYSKIQATNTWFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGLTCDHYEEAKITCSAHREPRLVGGDIPCSGR
VEVKHGDWTWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEENGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVA
PRPEGTCSHSRDVGVCVCSRYTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL
STPGGARFGKNGQIWRHMFHCTGTQHMGCPTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGP
TRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSGWTICDDSWDLSDAHVVCRQLGCGEAINATG
SAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLE
VFYNGAWGTVGKSSMSETTVGVVCRQLGCADKGINPASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPW
EKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSGWTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFF
EAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDAANCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSS
FIAVGILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDLDMNSSSGLWVLG
GSIAAAELISVSKFLPISGMEKEAILGSLDAYNGQE

5 SEQ ID NO: 4 Isoforma 3 (identificador: Q86VB7-3). También conocida como: Variante de cola corta

La secuencia de aminoácidos de esta isoforma difiere de la secuencia canónica en lo siguiente:

1115-1156: ENSHESADFSAAELISVSKFLPISGMEKEAILSHTTEKENGNL → GGHSEPH

MSKLRMVLLLEDSSGSADFRRHFVNLSPTTITVVLSSACFVTSSSLGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQE
EWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHSN
CTHQQDAGVTCSDGSNLEMLRTRGGNMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSG
SSNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSLRLVDGVTECSGRLE
VRFQGEWGTICDDGWDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHEPAIWQCKHHEW
GKHHCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRGAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGSAL
KTSYQVYSKIQATNTWFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGGLTCDHYEEAKITCSAHREPRVLGGDIPCSGR
VEVKHGDWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSI LGGAHFGEGNGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVA
PRPEGTCSSSRDVGVCSSRYTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL
STPGGARFGKNGQIWRHMFHCTGTGEQHMGDPCVTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGP
TRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSGWTICDDSWDLSDAHVVCRQLGCGEAINATG
SAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLE
VFYNGAWGTGKSSMSETTVGVVCRQLGCADKGINPASLKDAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPW
EKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGSGWTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFK
EAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSS
FIAVGILGVVLLAIFVALFFLTCKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDLDLMNSSGGHSEPH

SEQ ID NO: 5 Isoforma 4 (identificador: Q86VB7-4)

La secuencia de aminoácidos de esta isoforma difiere de la secuencia canónica en lo siguiente:

579-579: R → SKTQKTSLIGSYTVKGTGLGSHSCLFLKPCLLP

1115-1156: ENSHESADFSAAELISVSKFLPISGMEKEAILSHTTEKENGNL → GGHSEPH

MSKLRMVLLLEDSSGSADFRRHFVNLSPTTITVVLSSACFVTSSSLGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQE
EWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGWGKHSN
CTHQQDAGVTCSDGSNLEMLRTRGGNMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSG
SSNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSLRLVDGVTECSGRLE
VRFQGEWGTICDDGWDSYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHEPAIWQCKHHEW
GKHHCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRGAGTVEVEIQRLLGKVCDRGWGLKEADVVCRLGCGSAL
KTSYQVYSKIQATNTWFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGGLTCDHYEEAKITCSAHREPRVLGGDIPCSGR
VEVKHGDWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSI LGGAHFGEGNGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVA
PRPEGTCSSSRDVGVCSSKTQKTSLIGSYTVKGTGLGSHSCLFLKPCLLPGYTEIRLVNGKTPCEGRVE
LKTGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVALSTPGGARFGKNGQIWRHMFHCTGTGEQHMGDPCVTAL
GASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRCAGRVEIYHE
GSGWTICDDSWDLSDAHVVCRQLGCGEAINATGSAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQN
CRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLEVFYNGAWGTGKSSMSETTVGVVCRQLGCADKGINP
ASLKDAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHG
GSGWTVCDDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSE
CGHKEDAAVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFIAVGILGVVLLAIFVALFFLTCKRRQRQLAVSSRG
ENLVHQIQYREMNSCLNADDLDLMNSSGGHSEPH

5

SEQ ID NO: 6 - Proteína: NP_004235.4:

MSKLRMVLLLEDSSGADFRRHFNLSPTTITVLLLLSACFVTSSLGGTDKELRLVDGENKCSGRVEVKVQE
 EWGTVCCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVSCRGNESALWDCKHDGKGHSN
 CTHQQDAGVTCSDGSNLEMLRTRGGNMCSGRIEIKFQGRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSG
 SSNFEGSGPIWFDLINCNGNESALWNCKHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSRLVDGVTECSGRLE
 VRFQGEWGTICDDGWDSDA AVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHPEAIWQCKHHEW
 GKHYCNHNEDAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRGAGTVEVEIQRLLGKVC DRGWGLKEADVCRQLGCGSAL
 KTSYQVYSKIQATNTWLFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGGLTCDHYEEAKITCSAHREPRVLGGDIPCSGR
 VEVKHGDTWGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFGEENGQIWAEEFQCEGHESHLSLCPVA
 PRPEGTCSHSRDVGVCSTRYTEIRLVNGKTPCEGRVELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVAL
 STPGGARFGKNGQIWRHMFHCTGTGEQHMGDCTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLLSSCNSSSLGP
 TRPTIPEESAVACIESGQLRLVNGGGRGRCAGRVEIYHEGSGWTICDDSWDLSDAHVVCRQLGCGEAINATG
 SAHFGEGTGPIWLDEMCKNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREACAGRLE
 VFYNGAWGTGKSSMSETTVGVVCRQLGCADKGKINPASLDKAMSIPMWVDNVQCPKGPDTLWQCPSSPW
 EKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVCDDSWDLDQAQVVCQQLGCGPALKAFK
 EAEFGQGTGPIWLVNEVKCKGNESSLWDCPARRWGHSECGHKEDA AVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSS
 FIAVGILGVVLLAIFVALFFLTKKRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNCLNADDLMLNSENSENSES
 ADFSAAELISVSKFLPISGMEKEAILLSHTEKENGNL

5 En la memoria descriptiva, la expresión "proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)" debe entenderse como un miembro de la familia de genes inducibles pequeños (GIP), que desempeña un papel en el reclutamiento de monocitos a sitios de lesión e infección. El gen para MCP-1 está en el cromosoma 17 de la región 17q11.2-q12. MCP-1 se ha encontrado en las articulaciones de las personas con artritis reumatoide en las que puede servir para reclutar macrófagos y perpetuar la inflamación en las articulaciones. MPC-1 también se ha encontrado a un nivel elevado en la orina de personas con lupus.

10 En la memoria descriptiva, la expresión "muestra de referencia" o "nivel de muestra de referencia" aplicada a sCD163 y MCP-1 debe entenderse como un nivel de referencia de sCD163 y/o MCP-1 detectado en una muestra obtenida de un individuo identificado con enfermedad renal, no debiéndose la enfermedad renal a la VVP, imitaciones de la GNS, GNS activa aguda u otras formas de GNS.

Los procedimientos de la invención son aplicables a individuos sanos (que no tienen enfermedad renal establecida), así como a individuos con GNS establecida, individuos en riesgo de tener GNS o individuos en riesgo de tener una recurrencia de GNS (brote de GNS).

15 La expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico del individuo, por ejemplo, sangre, suero, orina, saliva, tejido, líquido cefalorraquídeo y similares. Por lo general, la muestra biológica es, o se obtiene de, orina.

20 En la presente memoria descriptiva, Los términos "tratar", "tratamiento" o "tratamiento de inducción" se refieren a la administración de un medicamento, por ejemplo, de uno o más glucocorticoides o inmunosupresores, a un individuo que tiene, o es probable que tenga, GNS o un brote de GNS con el fin de inducir la remisión de la enfermedad o curar, sanar, prevenir, aliviar, mitigar, alterar, remediar, o mejorar la enfermedad. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del medicamento, por ejemplo, de un glucocorticoide, que se requiere para conferir el efecto terapéutico previsto en el individuo, cantidad que variará según el tipo de medicamento, la vía de administración, el tipo y la causa de la GNS/del brote de GNS, y la posible inclusión de otros agentes terapéuticos o excipientes. Los términos y expresiones se pueden usar indistintamente.

25 Para poner en práctica uno o más procedimientos de la presente invención, la composición farmacéutica (medicamento) descrita anteriormente se puede administrar por vía oral, por vía parenteral, mediante pulverización de inhalación, o por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

30 Una composición inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión estéril inyectable acuosa u oleaginosa, se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación de inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el

35 manitol, el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos, estériles, se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicérido son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, en especial, en sus versiones polioxieladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden

40 contener diluyentes o dispersantes de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. También se pueden usar otros tensioactivos de uso común, tales como Tweens o Spans u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables para fines de formulación.

Una composición para la administración oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral, incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, emulsiones, y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Por lo general, también se añaden sales lubricantes, tales como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Se puede preparar una composición para inhalación o aerosol nasal de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. También se puede administrar una composición que contenga compuestos multicíclicos condensados en forma de supositorios para la administración rectal.

El vehículo de la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el principio activo de fórmula (y preferentemente, capaz de estabilizarlo) y no perjudicial para el sujeto que se vaya a tratar. Por ejemplo, se pueden utilizar uno o más agentes solubilizantes, que forman complejos más solubles con los compuestos multicíclicos condensados, o más agentes solubilizantes, como vehículos farmacéuticos para la administración de los compuestos activos. Los ejemplos de otros vehículos incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y D&C Yellow n.º 10.

El término "glucocorticoide" debe entenderse como, en el contexto del tratamiento de la vasculitis de vasos pequeños y la GNS, un corticosteroide sintético diseñado para actuar como un agente antiinflamatorio. Los glucocorticoides típicos incluyen metilprednisolona, prednisolona (conocida como prednisona en América del Norte), dexametasona e hidrocortisona.

El término "inmunosupresor" debe entenderse como, en el contexto del tratamiento de la vasculitis de vasos pequeños y la GNS, un agente diseñado para suprimir o eliminar las células inmunitarias activadas. Los inmunosupresores típicos incluyen ciclofosfamida, rituximab, azatioprina, micofenolato de mofetilo y metotrexato.

Los anticuerpos específicos de sCD163 y los anticuerpos específicos de MCP-1 pueden producirse usando procedimientos que se conocen, en general, en la técnica. En particular, se pueden usar sCD163 (y MCP-1) purificadas para producir anticuerpos o para examinar bancos de agentes farmacéuticos para identificar aquellos que se unen específicamente a sCD163. Los anticuerpos contra sCD163 y los anticuerpos contra MCP-1 también pueden generarse usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Dichos anticuerpos pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab. Los anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, de camellos o de llamas) pueden tener ventajas en el desarrollo de inmuno-adsorbentes y biosensores (Muyldermans, S. (2001) *J. Biotechnol.* 74:277-302). Para la producción de anticuerpos, diferentes hospedadores incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, camellos, dromedarios, llamas, seres humanos y otros pueden ser inmunizados por inyección con sCD163 o con cualquier fragmento u oligopéptido de la misma (o inyección con MCP-1 o con cualquier fragmento u oligopéptido de la misma) que tenga propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie hospedadora, se pueden usar diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund, geles minerales tales como el hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, KLH y dinitrofenol.

Se prefiere que los oligopéptidos, los péptidos o los fragmentos usados para inducir anticuerpos contra sCD163 y contra MCP-1 tengan una secuencia de aminoácidos que consista en al menos aproximadamente 5 aminoácidos, y en general, que consista en al menos aproximadamente 10 aminoácidos. También es preferible que estos oligopéptidos, péptidos o fragmentos sean idénticos a una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína natural. Se pueden fusionar tramos cortos de aminoácidos de sCD163 y MCP-1 con los de otra proteína, tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH), y se pueden producir anticuerpos contra la molécula quimérica. Los anticuerpos monoclonales contra sCD163 y contra MCP-1 pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante estirpes celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos y la técnica del hibridoma de EBV. (Véase, por ejemplo, Kohler, G. y col. (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, D. y col. (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote, R. J. y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80:2026-2030; y Cole, S. P. y col. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 62:109-120).

Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", tales como el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón con genes de anticuerpos humanos, obteniéndose una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas, por ejemplo, Morrison, S. L. y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6855; Neuberger, M. S. y col. (1984) *Nature* 312:604-608; y Takeda, S. y col. (1985) *Nature* 314:452-454). Como alternativa, se pueden adaptar técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios, usando procedimientos conocidos en la materia, para producir anticuerpos monocatenarios específicos de sCD163 o específicos de MCP-1. Se pueden generar anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiótípica, mediante la combinación aleatoria de cadenas de bancos de inmunoglobulina combinatorios aleatorios (véase, por ejemplo, Burton, D. R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:10134-10137). También se pueden producir anticuerpos induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos, o examinando

bancos de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específica como se desvela en las referencias (véase, por ejemplo, Orlandi, R. y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:3833-3837; Winter, G. y col. (1991) *Nature* 349:293-299).

5 También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específicos para sCD163 y sitios de unión específicos para MCP-1. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂ producidos por la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab generados al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂.

10 Como alternativa, se pueden construir bancos de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (véase, por ejemplo, Huse, W. D. y col. (1989) *Science* 246:1275-1281).

15 Para el examen, se pueden usar diferentes inmunoensayos a fin de identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. En la técnica, se conocen numerosos protocolos para ensayos de unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas. Dichos inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejos entre sCD163 y su anticuerpo específico, y también la formación entre MCP-1 y su anticuerpo específico. En general, se usa un inmunoensayo a base de anticuerpos monoclonales de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos hacia dos epítomos de sCD163 que no interfieren, pero también se puede emplear un ensayo de unión competitiva. Se pueden usar diferentes procedimientos, tales como el análisis de Scatchard junto con técnicas de radioinmunoensayo para evaluar la afinidad de los anticuerpos por sCD163 y por MCP-1. La afinidad se expresa como una constante de asociación, K_a, que se define como la concentración molar del complejo de sCD163-anticuerpo dividida entre las concentraciones molares de antígeno libre y anticuerpo libre en condiciones de equilibrio. Se puede hacer un análisis similar para el complejo de MCP-1-anticuerpo. La K_a determinada para una preparación de anticuerpos policlonales, que son heterogéneos en sus afinidades por múltiples epítomos sCD163 (o MCP-1), representa la afinidad o avidez media, de los anticuerpos por sCD163 (o MCP-1). La K_a determinada para una preparación de anticuerpos monoclonales, que son monoespecíficos de un determinado epítopo sCD163 (o MCP-1), representa una verdadera medida de la afinidad. Se prefieren las preparaciones de anticuerpos de alta afinidad con K_a que varía de aproximadamente 10⁹ a 10¹² l/mol para su uso en inmunoensayos en los que el complejo de sCD163-anticuerpo (o complejo de MCP-1-anticuerpo) debe resistir manipulaciones rigurosas.

30 Además, se pueden evaluar el título y la avidez de las preparaciones de anticuerpos policlonales para determinar la calidad y la idoneidad de dichas preparaciones para determinadas aplicaciones corriente abajo. Por ejemplo, una preparación de anticuerpos policlonales que contiene al menos 1-2 mg de anticuerpo específico/ml, preferentemente, 5-10 mg de anticuerpo específico/ml, en general, se emplea en procedimientos que requieren la precipitación de complejos de sCD163-anticuerpo (o complejos de MCP-1-anticuerpo). En general, se dispone de procedimientos de evaluación de la especificidad, el título y la avidez de los anticuerpos, y pautas para la calidad y el uso de anticuerpos en diferentes aplicaciones.

40 Se pueden describir realizaciones de la invención a través de módulos funcionales, que se definen mediante instrucciones ejecutables por ordenador grabadas en medios legibles por ordenador, y que hacen que un ordenador realice las etapas del procedimiento al ejecutarse. Los módulos están separados por función en aras de la claridad. Sin embargo, se ha de entender que los módulos/sistemas no necesitan corresponder a bloques de código diferenciados, y las funciones descritas pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de diferentes partes de código almacenadas en diferentes medios y ejecutadas en diferentes momentos. Asimismo, se ha de apreciar que los módulos pueden realizar otras funciones, por tanto, los módulos no se limitan a tener funciones o un conjunto de funciones en particular.

45 El medio de almacenamiento legible por ordenador n.º 30 puede ser cualquier medio tangible disponible al que pueda acceder un ordenador. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen medios tangibles extraíbles y no extraíbles, volátiles y no volátiles, implantados en cualquier procedimiento o tecnología para el almacenamiento de la información, tal como instrucciones legibles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador incluyen, pero sin limitación, RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria de solo lectura), EPROM (memoria de solo lectura programable y borrrable), EEPROM (memoria de solo lectura programable y borrrable eléctricamente), memoria flash u otra tecnología de memoria, CD-ROM (memoria de solo lectura de disco compacto), DVD (discos versátiles digitales) u otros medios de almacenamiento óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, medios de almacenamiento en disco magnético u otros medios de almacenamiento magnético, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y cualquier otro medio tangible que pueda usarse para almacenar la información deseada y al que pueda acceder un ordenador, incluyendo cualquier combinación adecuada de lo anterior.

60 Los datos legibles por ordenador incorporados en uno o más medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden definir instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas que, como resultado de ser ejecutados por un ordenador, Instruyen al ordenador para que realice una o más de las funciones descritas en el presente documento, y/o diferentes realizaciones, variaciones y combinaciones de las mismas. Dichas instrucciones pueden estar escritas en cualquiera de una pluralidad de lenguajes de programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C,

C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje ensamblador COBOL y similares, o cualquiera de una variedad de combinaciones de los mismos. Los medios de almacenamiento legibles por ordenador a los que se incorporan dichas instrucciones pueden residir en uno o más de los componentes de un sistema, o puede distribuirse un medio de almacenamiento legible por ordenador descrito en el presente documento entre uno o más de dichos componentes.

- 5 Los medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden ser transportables de manera que las instrucciones almacenadas en los mismos puedan cargarse en cualquier recurso informático para implementar los aspectos de la presente invención analizados en el presente documento. Además, se ha de tener en cuenta que las instrucciones almacenadas en el medio legible por ordenador, descrito anteriormente, no se limitan a las instrucciones incorporadas como parte de un programa de aplicación que se ejecute en un ordenador host. Más bien, las instrucciones pueden incorporarse como cualquier tipo de código informático (por ejemplo, software o microcódigo) que se pueda emplear para programar un ordenador para implementar los aspectos de la presente invención. Las instrucciones ejecutables por ordenador pueden estar escritas en un lenguaje informático adecuado o en una combinación de diferentes lenguajes adecuados. Los expertos en la materia conocen los procedimientos básicos de biología computacional, y se describen en, por ejemplo, Setubal y Meidanis y col., "Introduction to Computational Biology Methods" (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), "Computational Methods in Molecular Biology", (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, "Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine" (CRC Press, Londres, 2000), y Ouelette y Bzevanis, "Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins" (Wiley & Sons, Inc., 2ª ed., 2001).

- 20 Los módulos funcionales de determinadas realizaciones de la invención incluyen como mínimo un sistema de determinación n.º 40, un dispositivo de almacenamiento n.º 30, un módulo de comparación n.º 80 y un módulo de visualización n.º 110. Los módulos funcionales se pueden ejecutar en uno o múltiples ordenadores, o usando una o múltiples redes de ordenadores. El sistema de determinación tiene instrucciones ejecutables por ordenador para proporcionar, por ejemplo, niveles de proteína, ADN o ARN en forma legible por ordenador.

- 25 El sistema de determinación n.º 40 puede comprender cualquier sistema de detección de los niveles de sCD163 (o niveles de MCP-1) en comparación con los niveles en una muestra de referencia. Se pueden usar procedimientos convencionales tales como un ELISA, RT-PCR, etc.

- El dispositivo de almacenamiento n.º 30 puede leer la información determinada en el sistema de determinación. Como se usa en el presente documento, el "dispositivo de almacenamiento" pretende incluir cualquier aparato informático o de procesamiento adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Los ejemplos de un aparato electrónico adecuado para su uso con la presente invención incluyen un aparato informático independiente, redes de telecomunicaciones de datos, incluyendo redes de área local (LAN), redes de área amplia (WAN), Internet, Intranet y Extranet, y sistemas de procesamiento informático locales y distribuidos. Los dispositivos de almacenamiento también incluyen, pero sin limitación: medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquetes, medios de almacenamiento en disco duro, cinta magnética, medios de almacenamiento ópticos tales como CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónico como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, discos duros generales e híbridos de estas categorías, tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. El dispositivo de almacenamiento está adaptado o configurado para tener registrado en la misma información de secuencias de ácido nucleico. Dicha información se puede proporcionar en forma digital que se puede transmitir y leer electrónicamente, por ejemplo, por Internet, en disquete, por USB (bus en serie universal) o mediante cualquier otro modo de comunicación adecuado.

- Como se usa en el presente documento, "almacenado" se refiere a un procedimiento de codificación de información en el dispositivo de almacenamiento. Los expertos en la materia pueden adoptar fácilmente cualquiera de los procedimientos conocidos en la actualidad para registrar información en medios conocidos para generar productos que comprenden información relacionada con los niveles de sCD163 (y/o MCP-1).

- 45 En una realización, se comparan los datos de referencia almacenados en el dispositivo de almacenamiento para su lectura por el módulo de comparación, por ejemplo, la detección de niveles de sCD163 (y/o MCP-1) en una muestra, y se correlacionan con la recurrencia de la GNS o con el hecho de padecer GNS.

- El "módulo de comparación" n.º 80 puede usar una variedad de programas y formatos de software disponibles para el operativo de comparación para comparar niveles de datos de sCD163 determinados en el sistema de determinación con las muestras de referencia y/o los datos de referencia almacenados. En una realización, el módulo de comparación está configurado para usar técnicas de reconocimiento de patrones para comparar la información de una o más entradas con uno o más patrones de datos de referencia. El módulo de comparación puede configurarse usando software existente disponible en el mercado o gratuitos para comparar patrones, y puede optimizarse para determinadas comparaciones de datos que se realicen. El módulo de comparación proporciona información legible por ordenador relacionada con los niveles de sCD163 (y/o MCP-1) en la muestra.

El módulo de comparación, o cualquier otro módulo de la invención, puede incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX) en el que se ejecute un sistema de gestión de bases de datos relacionales, una aplicación World Wide Web y un servidor World Wide Web. La aplicación World Wide Web incluye el código ejecutable necesario para generar sentencias del lenguaje de la base de datos (por ejemplo, sentencias de lenguaje SQL (*Structured Query Language*)).

En general, los ejecutables incluirán sentencias SQL embebidas. Además, la aplicación World Wide Web puede incluir un archivo de configuración que contenga punteros y direcciones a las diferentes entidades de software que comprenden el servidor, así como a las diferentes bases de datos externas e internas a las que se debe acceder para atender las solicitudes de los usuarios. El archivo de configuración también dirige las solicitudes de recursos del servidor al hardware apropiado, ya que puede ser necesario si el servidor se distribuye en dos o más ordenadores separados. En una realización, el servidor World Wide Web admite un protocolo TCP/IP. Las redes locales tales como esta a veces se denominan "Intranets". Una ventaja de dichas Intranets es que permiten una fácil comunicación con las bases de datos de dominio público que residen en la World Wide Web (por ejemplo, el sitio World Wide Web de GenBank o Swiss Pro). Así pues, en una determinada realización preferida de la presente invención, los usuarios pueden acceder directamente a los datos (a través de enlaces de hipertexto, por ejemplo) que residen en bases de datos de Internet usando una interfaz HTML proporcionada por navegadores web y servidores web.

El módulo de comparación proporciona un resultado de comparación legible por ordenador que puede procesarse en forma legible por ordenador mediante criterios predefinidos o criterios definidos por un usuario, para proporcionar un contenido basado en parte en el resultado de la comparación que puede almacenarse y enviarse según lo solicite un usuario usando un módulo de visualización n.º 110.

En una realización de la invención, el contenido basado en el resultado de la comparación se muestra en un monitor n.º 120 de ordenador. En una realización de la invención, el contenido basado en el resultado de la comparación se muestra a través de medios imprimibles n.º 130, n.º 140. El módulo de visualización puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para recibir de un ordenador y mostrar información legible por ordenador a un usuario. Los ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, ordenadores de uso general, tales como los basados en el procesador de tipo Intel PENTIUM, Motorola PowerPC, Sun UltraSPARC, procesadores Hewlett-Packard PARISC, cualquiera de una variedad de procesadores disponibles en Advanced Micro Devices (AMD) de Sunnyvale, California, o cualquier otro tipo de procesador, dispositivos de visualización tales como pantallas planas, tubos de rayos catódicos y similares, así como impresoras de ordenador de diferentes tipos.

En una realización, se usa un navegador de la World Wide Web para proporcionar una interfaz de usuario para mostrar el contenido en función del resultado de la comparación. Debe entenderse que se pueden adaptar otros módulos de la invención para tener una interfaz de navegador web. A través del navegador web, un usuario puede construir solicitudes para recuperar datos del módulo de comparación. Así pues, el usuario normalmente punteará y hará clic en elementos de la interfaz de usuario, tales como botones, menús desplegables, barras de desplazamiento y similares empleados convencionalmente en interfaces gráficas de usuario.

Por lo tanto, los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan sistemas que (y medios legibles por ordenador para hacer que los sistemas informáticos) realicen procedimientos como se describe en las Declaraciones de invención anteriores, por ejemplo (a) procedimientos de identificación de un individuo con GNS activa o que padece un brote de GNS, (b) procedimientos de identificación de un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la continuación con el tratamiento para la GNS (evaluación de la respuesta al tratamiento de inducción), (c) procedimientos de identificación de un individuo con mayor probabilidad de obtener beneficios de la interrupción del tratamiento para la GNS o de un nivel reducido de tratamiento (evaluación de la respuesta al tratamiento de inducción), (d) procedimientos de distinción del brote de GNS de otras causas de deterioro clínico en un individuo que se sabía que tenía GNS o una enfermedad autoinmunitaria sistémica normalmente asociada con la GNS (distinción de la vasculitis de vasos pequeños de imitaciones de la GNS); y (e) procedimientos de tratamiento de un individuo con GNS establecida o recurrencia de GNS, y de tratamiento de dicho individuo con glucocorticoides y/o terapia inmunosupresora de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Los sistemas y los medios legibles por ordenador descritos en el presente documento son realizaciones meramente ilustrativas de la invención para realizar procedimientos de diagnóstico en un individuo. Son posibles variaciones de los sistemas y de los medios legibles por ordenador descritos en el presente documento.

Los módulos de la máquina, o los usados en el medio legible por ordenador, pueden adoptar numerosas configuraciones. Por ejemplo, la función puede proporcionarse en una sola máquina o distribuirse en varias máquinas.

Los expertos en la materia conocerán los procedimientos de análisis de una muestra biológica en busca de la presencia de uno o más biomarcadores, por ejemplo, mediante inmunodetección. En la presente memoria descriptiva, se ha de entender que el término "inmunodetección" significa un anticuerpo marcado para facilitar la detección. Es decir, cuando se incorpora otra molécula en el anticuerpo, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado. Se conocen diferentes procedimientos de marcaje en la técnica, y pueden usarse, por ejemplo, radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, marcadores de epítopos), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio y toxinas tales como toxina de la tos ferina, bromuro de etidio, etopósido, vincristina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, y sus análogos u homólogos. Dichos ensayos de inmunodetección o inmunoensayos incluyen,

pero sin limitación, ensayos de inmunoprecipitación, ensayos basados en el ensayo de inmutaoabsorción ligado a una enzima (ELISA), ensayos de varilla de inmersión, microscopía de inmutofluorescencia, inmutoensayo magnético, radioinmutoensayo, inmutoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmutodifusión, ensayos de aglutinación y ensayos de transferencia Western.

5 Otros procedimientos de detección de biomarcadores serán bien conocidos por los expertos en el campo de la proteómica. Por ejemplo, se pueden generar matrices de proteínas que estén hechas a medida para analizar la presencia de autoanticuerpos específicos. La empresa RZPD (www.rzpd.de) proporciona un servicio para la producción de macromatrices personalizadas. Otros procedimientos para la detección de los biomarcadores de la invención serían el uso de ELISA, cuyos detalles serán bien conocidos por los expertos en la materia.

10 Otros procedimientos de detección de los biomarcadores que son bien conocidos por los expertos en la materia son aquellos que detectan los oligonucleótidos que codifican los biomarcadores de interés, por ejemplo, procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcriptasa inversa (RT-PPC), transferencia de Southern y Northern, hibridación fluorescente *in situ* e hibridación de ácido nucleico a micromatriz.

15 Las proteínas usadas en estas técnicas se pueden preparar usando técnicas convencionales de ADN recombinante junto con la información de secuencias proporcionada en el presente documento y en la base de datos NCBI con referencias cruzadas (véase el Listado de secuencias). En el caso de muchas de las proteínas de SECUENCIA ID NO 1 a 6, hay clones bacterianos diseñados para expresar la proteína de interés disponibles en diferentes fuentes comerciales.

20 En la memoria descriptiva, la expresión "dispositivo de correlación" debe entenderse como un aparato que es capaz de correlacionar la señal detectable con un nivel elevado de sCD163, y opcionalmente, de MCP-1. En una realización, el dispositivo comprende un módulo de referencia comparativo (o dispositivo de correlación), tal como una carta de colores, usado en un aparato de diagnóstico *in vitro*, tal como un ensayo con tira reactiva o un ELISA, para determinar un nivel elevado de sCD163, y opcionalmente, de MCP-1, en una muestra biológica. En otra realización, el dispositivo de correlación puede comprender un módulo de detección configurado para la detección de la señal detectable, un
25 módulo de comparación configurado para comparar la señal detectable con una señal de referencia y proporcionar un resultado relacionado con el hecho de que el nivel de sCD163 y, opcionalmente, de MCP-1, sea elevado, y un módulo de visualización para mostrar los resultados.

Materiales y procedimientos

Inducción de vasculitis autoinmunitaria experimental (VAE)

30 Se indujo vasculitis autoinmunitaria experimental, un modelo de vasculitis con MPO-ANCA, en ratas como se ha descrito previamente. En resumen, se inmunizaron ratas Wistar-Kyoto (WKY) de 6 semanas de vida con 3,2 mg/kg de MPO humano (amablemente obsequiado por Biovitrum, Suecia) en adyuvante completo de Freund (CFA, *Complete Freund's Adjuvant*) junto con 1 µg de toxina de tos ferina (Sigma Aldrich). Las ratas se reforzaron con 4 µg de LPS y 0,1 mg/kg de MPO (sin adyuvante) después de 28 y 35 días respectivamente. Los animales de control se dejaron sin
35 inmunizar. Se recogieron muestras de orina en varios puntos de tiempo durante la progresión de la VAE, colocando a las ratas en jaulas metabólicas durante 24 horas. Las muestras de orina se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos a 4 °C y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. Se midieron los niveles de sCD163 en orina pura usando un kit de receptor secuestrador de hemoglobina soluble/sCD163 de rata (BlueGene), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ratas se sacrificaron en los días 28 y 56 después de la inmunización, y se tiñeron cortes renales con hemotoxina y eosina, y se realizaron tinciones periódicas con ácido de Schiff. Los estudios en animales fueron aprobados por el comité de ética local, y cumplían con una licencia de proyecto otorgada por la Junta de Medicamentos de Irlanda.

Inmunohistoquímica del tejido renal con VAE

Se seccionaron riñones extraídos de ratas 56 días después de la inducción de la VAE y se bloquearon con suero de cabra normal al 20 %. Se tiñeron los cortes doblemente con anticuerpos específicos de CD68 de rata (policlonales de conejo, Abcam) y de CD163 de rata (anti-ED2 de rata de ratón, AbD Serotec, usado para todas las tinciones de CD163 de rata), seguidos de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con alexafluor 568 (Life Technologies) y anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con alexafluor 488 (Abcam). Las secciones también se tiñeron
45 doblemente con anticuerpos específicos de CCR7 de rata (monoclonales de conejo, Abcam) o de CD206 de rata (policlonales de conejo, Abcam) y CD163 de rata, seguidos de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con alexafluor 488 y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con alexafluor 568, como anteriormente. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Life Technologies). Se calificó el número de células CD68+ y CD163+ por glomérulo con enmascaramiento para al menos 30 glomérulos y diez campos de 40 aumentos (sin glomérulos) usando un microscopio fluorescente (Nikon Eclipse 90i). Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal (Zeiss LSM 510).

Reclutamiento y evaluación clínica

Se reclutaron pacientes con VVP (que comprende granulomatosis con poliangeítis, poliangeítis microscópica, granulomatosis eosinofílica con poliangeítis y enfermedad anti-GBM), controles sanos y controles con enfermedad a

través del Biobanco de Enfermedades Renales Raras (ERR). Los controles con enfermedad (Tabla 1) se dividieron en aquellos con glomerulonefritis en los que se puede esperar infiltración de macrófagos glomerulares, aquellos sin glomerulonefritis y pacientes de la unidad de cuidados intensivos con lesión renal aguda no mediada por la inmunidad, fallo multisistémico y sepsis. Para abordar esta última, los presentes inventores probaron un gran número de muestras de orina del estudio de validación prospectiva de biomarcadores de lesiones renales agudas y definiciones en pacientes críticos. Las muestras se archivaron hasta su análisis en el Biobanco de ERR, y el registro vinculado se usó para definir los detalles clínicos. El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional (referencia 2012/38/04) y todos los sujetos proporcionaron un consentimiento informado por escrito. Todos los pacientes con vasculitis se clasificaron de acuerdo con los criterios de clasificación de consenso de Chapel Hill (Jennette, J. C., y col., 2012, "Revised international Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides". *Arthritis Rheum*, 2013. 65(1): pág. 1-11). El grupo de control sano se presentó a sí mismo como sano y se sometió a un examen de orina con tira reactiva normal. La actividad de la enfermedad de vasculitis se registró usando la puntuación de actividad de vasculitis de Birmingham (BVAS, *Birmingham Vasculitis Activity Score*) (Stone, J. H., y col., "A disease-specific activity index for Wegener's granulomatosis: modification of the Birmingham Vasculitis Activity Score. International Network for the Study of the Systemic Vasculitides" (INSSYS). *Arthritis Rheum*, 2001. 44(4): pág. 912-20). Se consideró que la vasculitis activa estaba presente con una puntuación BVAS ≥ 0 . La vasculitis renal activa se definió como BVAS > 0 con uno o más elementos renales, incluyendo la presencia de hematuria según lo determinado mediante tira reactiva de orina; las muestras de orina no se evaluaron de forma rutinaria para detectar la presencia de cilindros o glóbulos rojos dismórficos. Se incluyeron en el análisis a los pacientes con enfermedad recién diagnosticada y con brotes de la enfermedad. La presencia o ausencia de vasculitis activa se juzgó sin conocer el nivel de sCD163 por referencia al estado clínico y a la respuesta a la terapia un mes después de obtener la muestra. Con el fin de evaluar el rendimiento de los biomarcadores, se asignó aleatoriamente a cada sujeto a una cohorte inicial o una de las dos cohortes de validación antes de la medición de los niveles de sCD163.

Tabla 1 Resumen de diagnósticos en la cohorte de controles con enfermedad. *GEFS = GlomeruloEsclerosis Focal y Segmentaria; #LRA = Lesión Renal Aguda

	N	Se espera infiltración de macrófagos glomerulares
Glomerulonefritis no vasculítica	30	
<i>Nefropatía por IgA</i>	9	Sí
<i>Nefritis lúpica</i>	2	Sí
<i>Glomerulopatía C3</i>	3	Sí
<i>Enfermedad de cambio mínimo/GEFS*</i>	6	No
<i>Crioglobulinemia</i>	2	Sí
<i>Otros</i>	8	Sí
Control con enfermedad sin inflamación glomerular	54	
<i>Nefroesclerosis hipertensiva</i>	12	No
<i>Nefropatía diabética</i>	11	No
<i>Nefritis intersticial</i>	3	No
<i>Infección de stent endovascular aórtico</i>	2	No
<i>Pielonefritis</i>	3	No
<i>Síndrome de Sjogren</i>	2	No
<i>Otra enfermedad renal primaria</i>	5	No
<i>Otra enfermedad extrarrenal</i>	16	No
Pacientes de la UTI sin sepsis ni LRA[#]	463	No
Pacientes de la UTI con sepsis, pero sin LRA[#]	286	No
Pacientes de la UTI con sepsis y LRA[#]	32	No

Tinción con CD163 de cortes de riñón humano

Además, se analizaron todos los sujetos sometidos a una biopsia renal indicada clínicamente en uno de los sitios de estudio (Beaumont Hospital) mediante inmunohistoquímica del tejido renal para determinar el grado y el patrón de expresión de CD163. Los cortes de tejido renal embebidos en cera de parafina y fijados con formalina se procesaron con el kit de detección ultraView Universal DAB en la máquina de inmunotinción automática Benchmark XT (Roche). Se usó el condicionamiento celular 1 (CC1, Roche) durante 30 minutos a 96 °C para recuperar el antígeno. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-CD163 humano de ratón (10D6, Abcam) y ref ab74604 (Abcam) a una dilución de 1/20 durante 40 minutos a 37 °C. La expresión de CD163 se cuantificó usando la técnica de Zhao y col (Zhao, L., David, M. Z., Hyjek, E., Chang, A. y Meehan, S. M. "M2 macrophage infiltrates in the early stages of ANCA-associated pauci-immune necrotizing GN". *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 54-62, doi:10.2215/CJN.03230314 (2015)). La expresión se evaluó en áreas de necrosis fibrinoidea/formación semilunar, dentro de glomérulos de aspecto normal, en la región periglomerular, dentro de los túbulos y en el espacio intersticial 11. Las puntuaciones se asignaron de la siguiente manera: 0 = sin células CD163+, 1 = 1-5 células CD163+, 2 = 6-10 células CD163+ y 3 = más de 10 células CD163+. Los valores se calcularon por corte transversal glomerular para cada una de las tres regiones glomerulares, y mediante

la estimación de la fracción de compartimentos tubulares o intersticiales con células CD163+ y multiplicando esto por la puntuación. Para obtener una medida cuantitativa que comparar con el valor de sCD163 en orina, se realizó un análisis de imagen en muestras con un valor de sCD163 en orina emparejado usando el Sistema Integrador Visiopharm (Visiopharm, Hoersholm, Dinamarca) (Figura complementaria 5). Se cuantificó el número de núcleos asociados con la tinción de CD163 en los compartimentos glomerulares, glomerulares obsoletos y extraglomerulares (corteza renal), aplicándose el mismo umbral a todos los cortes.

Microdissección y cuantificación del ARNm de CD163 en riñón humano

Las muestras de biopsia renal humana y los datos de expresión de micromatrices Affymetrix se obtuvieron en el marco del banco europeo de ADNc renal-banco de biopsias Kröner-Fresenius (Cohen y col *Kidney Int*, 61: 133-140, 2002) (véase la referencia (Martini y col JASN 2014 Vol 25, n.º 11, 2559-2572) para centros participantes). Se obtuvieron biopsias de pacientes tras el consentimiento informado y con la aprobación de los comités de ética locales. Tras una biopsia renal, el tejido se transfirió al inhibidor de RNasa y se microdisseccionó en fragmentos glomerulares y tubulares. Se aisló el ARN total de glomérulos microdisseccionados, se transcribió inversamente y se amplificó linealmente de acuerdo con un protocolo previamente informado (Cohen y col *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 103: 5682-5687, 2006). Los datos de expresión de micromatriz usados en este estudio proceden de pacientes individuales con nefropatía diabética (ND), enfermedad de cambio mínimo (ECM), nefropatía por IgA (IgA), glomeruloesclerosis focal segmentaria (GEFS), nefropatía membranosa (GNM) y vasculitis con ANCA (ANCA). Se usaron biopsias de riñón previas al trasplante de donantes vivos (DV) como tejido renal de control. Se realizaron la fragmentación, hibridación, tinción y obtención de imágenes de acuerdo con el manual técnico de análisis de expresión de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se realizó la normalización del archivo CEL con el procedimiento de la media robusta de múltiples chips usando RMAExpress (Versión 1.0.5) y la anotación CDF personalizada de Entrez-Gene humana de Brain Array versión 18 (<http://brainarray.mbni.med.um-ich.edu/Brainarray/default.asp>). Para identificar genes expresados diferencialmente, se aplicó el procedimiento SAM (*Significance analysis of Microarrays*, análisis de significación de micromatrices) usando TiGR (MeV, versión 4.8.1) (Tusher y col, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 98: 5116-5121, 2001). Se consideró estadísticamente significativo un valor q inferior al 5 %.

Medición de sCD163 en suero y muestras de orina de ser humano

Se recogió sangre venosa en tubos de suero y se dejó coagular a temperatura ambiente antes de centrifugarse a 1.500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se retiró el suero y se almacenó a -80 °C hasta el ensayo. Se centrifugaron las muestras de orina a 2.000 g durante 10 minutos a 4 °C, con almacenamiento del sobrenadante a -80 °C hasta el ensayo. Las muestras de la cohorte de validación de Groningen se procesaron de manera ligeramente diferente. Se centrifugó la sangre venosa a 2.000 g durante 10 minutos, tras lo que se recogió el suero y se almacenó a -20 °C hasta el ensayo. Se centrifugó la orina durante 15 minutos a 1.200 g, se recogió el sobrenadante, se diluyó 1:1 en PBS y se almacenó a -20 °C hasta el ensayo. Se determinaron los niveles de sCD163 en suero y orina mediante ELISA (DuoSets para CD163 humano de R&D systems, DY1607) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diluyeron muestras de suero y orina 1:400 y 1:4 respectivamente. El nivel de sCD163 en orina se normalizó con respecto al nivel de creatinina según lo determinado por una técnica de Jaffe modificada.

Investigación del impacto de la hematuria en el nivel de sCD163 en orina

Para evaluar si el sCD163 en orina era simplemente un marcador sustituto de la hematuria, se obtuvo orina de un control sano (confirmado previamente como negativo para sCD163) y se añadió a diluciones en serie de sangre anticoagulada. En cada dilución, se analizó la orina en busca de sangre mediante tira reactiva y mediante examen visual para detectar la hematuria macroscópica. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, se centrifugó la orina y se midieron los niveles de sCD163 como se ha descrito anteriormente.

Evaluación del impacto del almacenamiento prolongado y la congelación-descongelación en el nivel de sCD163

Para evaluar la estabilidad de sCD163 en condiciones normales de manipulación de la orina, se preparó una serie de alícuotas de una muestra de orina con un nivel elevado de sCD163 conocido y se almacenaron a temperatura ambiente, a 4 °C, a -20 °C y a -80 °C hasta una semana. Se extrajeron alícuotas a las 24 y 168 horas para el ensayo de sCD163 ($n = 6$ por condición), normalizándose el nivel con respecto al nivel en la muestra original. Luego se tomó orina almacenada del mismo paciente y se sometieron alícuotas a entre 1 y 6 ciclos de congelación-descongelación para evaluar el efecto sobre el nivel de sCD163.

Evaluación estadística

Los análisis se realizaron usando GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (Software GraphPad, San Diego, California, EE. UU.), SPSS (IBM, versión 21, Amrook, EE.UU.) y R. (R Foundation for Statistical Computing, versión 3.1.1, Vienna, Austria). Los datos se expresaron como la mediana $\pm$ intervalo intercuartil, y se consideraron significativos los valores $p < 0,05$. Las diferencias entre dos grupos se analizaron usando la prueba U de Mann-Whitney, mientras que las diferencias entre 3 o más grupos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de Dunn. Para evaluar la capacidad de sCD163 para predecir la vasculitis renal activa sobre la tasa de excreción de proteínas en la orina, se estimaron curvas de eficacia diagnóstica (ROC) características para sCD163, PPC en orina y su combinación, usando los datos de las cohortes combinadas. Cabe señalar que no se dispuso de la

cohorte completa para este análisis, por lo que el límite óptimo de sCD163 fue ligeramente diferente. Se usó la regresión logística para estimar la combinación de sCD163 y la tasa de excreción de proteína en la orina. La inferencia sobre las diferencias entre las curvas ROC se realizó mediante el remuestreo bootstrap. Se escogió el punto de las curvas que maximizaba la suma de la sensibilidad y la especificidad como un límite para predecir la vasculitis renal activa. Para la PCR, se usó el límite de laboratorio patrón de 15 mg/mmol. Los valores límite óptimos se usaron para predecir la vasculitis renal activa en la cohorte de validación y estimar la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo/negativo, los coeficientes de verosimilitud positivos/negativos.

Niveles de medición de la proteína quimioatrayente de los monocitos 1 (MCP-1)

Se midieron los niveles de MCP-1 en muestras biológicas (orina, suero y biopsia) como se ha descrito anteriormente para sCD163. MCP-1 también se puede medir en una muestra mediante ELISA, y se expone en Lieberthal y col. (Lieberthal J. G., Cuthbertson D., Carette S., Hoffman G. S., Khalidi N. A., Koenig C. L., Langford C. A., Maksimowicz-McKinnon K., Seo P., Specks U., Ytterberg S. R., Merkel P. A., Monach P. A.; "Vasculitis Clinical Research Consortium: urinary biomarkers in relapsing antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis". *J Rheumatol* 40: 674-683, 2013).

Resultados

CD163 se expresa en el riñón de ratas con VAE y aparece en la orina durante la fase de evolución de la vasculitis renal

Las ratas inmunizadas con MPO humano analizadas el día 28 resultaron tener GN proliferativa y formación semilunar ocasional (Figura 3). El día 56, las ratas tenían necrosis fibrinoide y glomerulonefritis semilunar, como se ha descrito anteriormente¹³, y había células CD163+ presentes en los compartimientos glomerular y tubulointersticial (Figura 3B-H). Para un fenotipado adicional de las células CD163+, se tiñó tejido renal con VAE para CCR7 (marcador de macrófagos de subtipo M1) y CD206 (marcador M2, Figura 3I-K). CD163 no se localizó junto con CCR7, pero se localizó de manera variable junto con CD206, habiendo también células CD163+CD206- presentes. Se midió la excreción urinaria de sCD163 en un transcurso de tiempo (Figura 3A) y, sorprendentemente, se descubrió que, aunque la evidencia histológica de enfermedad fue más grave en el día 56, el nivel de sCD163 en orina fue más alto el día 28 (media de $3,6 \pm 1,1$ ng/mmol). El nivel volvió al observado en los animales de control en el día 56 ($1,5 \pm 0,4$ ng/mmol) y continuó disminuyendo durante seis meses ($0,5 \pm 0,1$ ng/mmol). El nivel de sCD163 en orina se correlacionó con el grado de infiltración de macrófagos (Figura 3L).

CD163 se expresa a un nivel alto en los glomérulos de pacientes con vasculitis

Para evaluar el nivel de expresión de CD163 en el riñón de pacientes con vasculitis renal, primero, se midió el ARNm de CD163 en compartimientos glomerulares y tubulointersticiales microdisecados de la nefropatía diabética, enfermedad de cambio mínimo, nefropatía por IgA, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía membranosa, nefritis lúpica y vasculitis con ANCA (Figura 4). De todas las condiciones examinadas, CD163 se expresó al nivel más alto en los glomérulos y el tubulointersticio de pacientes con vasculitis con ANCA (factor de cambio de 23,4 y 7,5 veces por encima del control respectivamente, $p < 0,001$), observándose también una mayor expresión en la nefropatía diabética (factor de cambio de 5,2 veces por encima del control, $p < 0,001$), nefropatía por IgA (3,4 veces por encima del control, $p < 0,05$) y nefritis lúpica (7,4 veces por encima del control, $p < 0,001$). El grado de expresión del gen CD163 también fue el mayor en el compartimiento tubulointersticial de pacientes con vasculitis con ANCA (7,5 veces por encima del control, $p < 0,001$), observándose una menor elevación en la nefritis lúpica (2,0 veces por encima del control, $p < 0,05$). Se observó una alta expresión de CD163 tanto en los glomérulos como en el intersticio de pacientes con vasculitis renal activa. Resulta interesante la observación de CD163 en glomérulos que no parecían afectados según los marcadores histológicos. Los pacientes con enfermedad anti-GBM presentaron una mayor expresión de CD163 en los 5 compartimientos calificados, en particular, en mechones glomerulares no afectados histológicamente. La expresión de CD163 fue similar en pacientes positivos en MPO y PR3-ANCA. Sin embargo, cuando los pacientes se separaron según el diagnóstico en lugar de la especificidad por los autoanticuerpos, los pacientes con granulomatosis con poliangeítis (GPA) resultaron tener niveles relativamente bajos de expresión renal de CD163 (Figura 4C). Se observaron células CD163+ muy ocasionales en riñones sanos de donantes de trasplantes vivos (Figura 4E), y las medias lunas fibrosas cicatrizadas mostraron muy poca tinción con CD163 (Figura 4I).

El nivel de sCD163 en suero en pacientes con vasculitis no aumenta ni se correlaciona con el nivel de sCD163 en orina

Para evaluar si el nivel de sCD163 predecía lesión vasculítica, se midieron los niveles en suero de pacientes con vasculitis ($n = 243$, 59 activa y 184 en remisión), controles sanos ($n = 57$) y controles con enfermedad ($n = 37$, Figura 8). No hubo diferencias significativas en los niveles de sCD163 en suero en pacientes con vasculitis activa (mediana de 387 ng/ml, intervalo intercuartil de 283-613) en comparación con los pacientes con vasculitis en remisión (313 ng/ml, 226-472), controles con enfermedades (298 ng/ml, 236-475) y controles sanos (287 ng/ml, 226-463) (Figura 8).

Asimismo, los niveles de sCD163 en suero no se correlacionaron con los niveles de sCD163 en orina ($r = 0,15$) (Figura 8).

Los niveles de sCD163 en orina eran elevados en la vasculitis renal activa

Se midió sCD163 en orina en una cohorte inicial de 177 sujetos [14,6 % con vasculitis renal activa (n = 26), 5,9 % con vasculitis extrarrenal activa (n = 11) y 79,4 % en remisión (n = 140), Tabla 2]. Para tener en cuenta las diferencias en la concentración de orina entre los individuos, todos los valores de sCD163 se normalizaron con respecto a la creatinina urinaria. Los niveles de sCD163 en orina normalizados se elevaron significativamente en pacientes con vasculitis renal activa (0,56 ng/mmol) en comparación con los pacientes con vasculitis extrarrenal activa (0,12 ng/mmol), vasculitis renal en remisión (0,11 ng/mmol) y vasculitis extrarrenal en remisión (0,1 ng/mmol) (Figura 5A). Para evaluar si este hallazgo era un sustituto de la hematuria (que refleja la monocituria), se analizó sCD163 en orina de control con la adición de diluciones en serie de sangre, y se correlacionó el resultado con el análisis de hematuria realizado con tira reactiva de orina. La adición de sangre a la orina solo condujo a un aumento en el nivel de sCD163 cuando la concentración de sangre en la orina era > 2 %. La orina apareció realmente manchada de sangre hasta una concentración del 0,7 % y fue positiva en sangre según la tira reactiva hasta el 0,1 %, niveles a los que sCD163 era indetectable (Figura 7C). Para evaluar la estabilidad de sCD163 en orina, se almacenaron muestras en diferentes condiciones y se tomaron alícuotas para realizar análisis repetidos. No hubo cambios significativos en el nivel de sCD163 tras una semana de almacenamiento a temperatura ambiente, 4 °C o -20 °C, y el nivel de sCD163 fue estable durante hasta 4 ciclos de congelación-descongelación. Un mayor número de ciclos de congelación-descongelación causó una disminución significativa en el nivel de sCD163 (Figura 7A, B).

Tabla 2 Información demográfica y clínica para pacientes y controles. Los valores *p* muestran la significancia entre los grupos de pacientes en las cohortes de inicio, de validación interna y de validación externa. La edad se presenta como la mediana y un intervalo; todos los demás valores se presentan como *n* (%). GPA = Granulomatosis con Poliangeítis, PAM = Poliangeítis Microscópica, GEPA = Granulomatosis Eosinofílica con Poliangeítis, GBM = Membrana Basal Glomerular, TFGe = Tasa de Filtración Glomerular estimada, UTI = Unidad de Terapia Intensiva.

*En comparación con las cohortes inicial, de validación 1 y de validación 2. -En comparación con las cohortes de VVP.

1	Inicial	Cohorte de validación 1	Cohorte de validación 2	Validación externa (n = 52)		Controles con enfermedad	Controles sanos	Valor <i>p</i>
n	177	155	133	Pacientes	Controles sanos			
Edad (mediana, intervalo)	63,5 (21,2-90,2)	60,3 (16,7-95,3)	59,9 (18,1-91,0)	39	13	865	55	0,03
				58,6 (31,3-81,9)	53,8 (34,6-64,1)		52,1	
Varón, n (%)	87 (49)	97 (62,6)	80 (60,1)	16 (41,1)	6 (46,2)	55,4 (16,6-87,3)	20 (36,3)	0,0004
Diagnóstico, n (%)						411 (47,6)		0,07
GPA	101 (57,1)	94 (60,6)	57 (42,9)	28 (71,8)			30	
PAM	54 (31,1)	49 (31,6)	59 (44,3)	11 (28,2)			54	
GEPA	12 (6,8)	6 (3,9)	8 (6,0)	0 (0)			Sin glomerulonefritis	
Enfermedad anti-GBM	3 (1,7)	3 (1,9)	5 (3,8)	0 (0)			UTI: Sepsis +/- LRA	
Doble positivo	6 (3,4)	3 (1,9)	4 (3,0)	0 (0)			UTI: Sin sepsis + LRA	
Características de la enfermedad, n (%)							UTI: Sin sepsis / sin LRA	0,01*
Activa (renal)	26 (14,6)	15 (9,7)	33 (24,8)	24 (61,5)				
Activa (extrarrenal)	11 (5,9)	9 (5,8)	6 (4,5)	3 (7,7)				
Remisión	140 (79,4)	131 (84,5)	94 (70,7)	12 (30,8)				
Función renal, n (%)								0,3*
TFGe < 30	35 (19,8)	34 (21,9)	33 (24,8)	14 (35,9)			258 (29,8)	
TFGe 30-60	50 (28,2)	49 (31,6)	44 (33,1)	10 (25,6)			313 (36,2)	
TFGe > 60	92 (52)	72 (46,5)	56 (42,1)	15 (38,5)			294 (34,0)	
Díálisis	9 (5,1)	3 (1,9)	12 (9,0)	N/D			20 (2,3)	

Validación de la estrecha asociación entre el nivel elevado de sCD163 en orina y la vasculitis renal activa

Usando los datos de la cohorte inicial, se generó una curva característica de eficacia diagnóstica (ROC) para identificar la vasculitis renal activa en pacientes con un diagnóstico conocido de vasculitis (Figura 5). El área bajo la curva ROC fue de 0,94, indicando un excelente potencial biomarcador. Esto se usó para definir un valor límite óptimo de 0,3 ng/ml/mmol, y se aplicó a la cohorte de validación 1, que consistía en 155 pacientes con vasculitis, 8 controles sanos y 18 controles con enfermedad, y la cohorte de validación 2, que consistía en 133 pacientes, 13 controles sanos y 39 controles con enfermedad. La cohorte de validación 1 proporcionó resultados prácticamente idénticos a los de la cohorte inicial, siendo sCD163 significativamente elevado en la orina de pacientes con vasculitis renal activa en comparación con pacientes con vasculitis extrarrenal activa ($p < 0,0001$), pacientes en remisión con vasculitis renal previa ($p < 0,0001$) o vasculitis extrarrenal ($p < 0,0001$) previa, controles con enfermedad ($p < 0,01$) y controles sanos ($p < 0,0001$, Figura 5B). La cohorte de validación 2 proporcionó resultados prácticamente idénticos a los de la cohorte inicial, siendo sCD163 significativamente elevado en la orina de pacientes con vasculitis renal activa en comparación con pacientes con vasculitis extrarrenal activa y pacientes en remisión con vasculitis renal o extrarrenal previa (Figura 5C).

Usando el valor límite de 0,3 ng/ml/mmol, el 87 % y el 73 % de los pacientes activos con vasculitis renal fueron positivos, en comparación con el 0 % (vasculitis extrarrenal activa), el 1,2 % (vasculitis renal en remisión), el 4 % (vasculitis extrarrenal en remisión), el 9 % (controles con enfermedad) y el 0 % (controles sanos). Las estadísticas de biomarcadores para las cohortes combinadas se resumen en la Tabla 3. Por el contrario, ninguno de los pacientes con vasculitis extrarrenal activa dio positivo. Las tasas de falsos positivos en los pacientes en remisión fueron del 1,5 % y 3,4 % respectivamente para los pacientes con vasculitis renal y extrarrenal previa. La estratificación de los valores según la especificidad por ANCA (PR3 frente a MPO) no reveló diferencias en la capacidad de sCD163 para identificar la vasculitis renal activa (Figura 8). En la Tabla 4, se resumen las estadísticas de los biomarcadores para el diagnóstico de la vasculitis renal activa dentro de las cohortes de vasculitis generales. Los valores notables son la especificidad del 96 % y el coeficiente de verosimilitud positivo de 20,8. Los valores de sCD163 en orina no normalizados (con respecto a la creatinina) también funcionaron bien, aunque la especificidad (92 %) y el coeficiente de verosimilitud positivo (10,0) fueron menores que para los valores normalizados (Tabla 4). En los individuos en los que se midió sCD163 en muestras en serie después de la presentación con enfermedad activa, el nivel disminuyó rápidamente con el tratamiento y permaneció bajo. En aquellos con vasculitis extrarrenal activa, el nivel fue bajo en todos los puntos de tiempo (Figura 5E). Para evaluar la relación entre la expresión renal de la proteína CD163 y el nivel de sCD163 en orina, se identificaron 25 casos con tejido renal obtenido aproximadamente al mismo tiempo que la muestra de orina de prueba. De estos, había suficiente tejido glomerular disponible para el análisis de 17 pacientes y suficiente tejido extraglomerular para el análisis de 20 pacientes. Resultó haber una correlación entre el número de células positivas en CD163 de los glomérulos y el nivel vinculado de sCD163 en orina (Figura 9). La correlación con la tinción extraglomerular fue más débil.

Tabla 3. Generación del límite óptimo en la cohorte inicial, con aplicación a la cohorte de validación. Las estadísticas se determinaron analizando primero los datos de la cohorte inicial para definir el valor límite óptimo, y aplicándolo a la cohorte de validación. AUC = área bajo la curva (*Area Under Curve*) ROC, VPP = Valor Predictivo Positivo, VPN = Valor Predictivo Negativo.

	AUC	Límite	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	CVP	CVN
<i>Inicial</i>								
sCD163 normalizado	0,96	0,3	0,96	0,94	0,69	0,99	14,7	0,05
<i>Validación</i>								
sCD163 normalizado	0,97	0,3	0,87	0,98	0,81	0,99	43,5	0,13
<i>Validación 2</i>								
sCD163 normalizado	0,94	0,3	0,73	0,98	0,92	0,92	36,5	0,28

Tabla 4. Atributos biomarcadores de sCD163 en orina normalizados y no normalizado para diferenciar la vasculitis renal activa de la vasculitis renal en remisión. Las estadísticas se determinaron mediante el análisis de datos combinados de las cohortes inicial y de validación. AUC = área bajo la curva (*Area Under Curve*) ROC, VPP = Valor Predictivo Positivo, VPN = Valor Predictivo Negativo.

	AUC	Límite	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	CVP	CVN
SCD163 normalizado	0,93	0,3	0,83	0,96	0,80	0,97	20,75	0,17
SCD163 no normalizado	0,91	1,3	0,80	0,92	0,64	0,96	10,0	0,22

Validación externa de la asociación entre el nivel elevado de sCD163 en orina y la vasculitis renal activa

Se interrogó a una cohorte holandesa independiente que comprendía 52 sujetos (39 pacientes con VPP y 13 controles sanos) para validar los hallazgos. Estos análisis confirmaron la capacidad del sCD163 urinario para identificar la

enfermedad renal activa en pacientes con VVP. sCD163 resultó estar significativamente elevado en la orina de pacientes con vasculitis renal activa en comparación con los pacientes en remisión con afectación renal previa y con los controles sanos (Figura 6B). Usando el valor límite de 0,3 ng/mmol, el 79 % de los pacientes con vasculitis renal activa fue diagnosticado positivamente. No se observaron casos falsos positivos en los pacientes con vasculitis extrarrenal activa, vasculitis renal en remisión o controles sanos.

Los pacientes con enfermedad renal sin glomerulonefritis semilunar activa no presentan un nivel elevado de sCD163 en orina

Para examinar la especificidad del nivel elevado de sCD163 en orina para la vasculitis renal activa, se midió el nivel de sCD163 en orina en una serie de grupos de control con enfermedad (Figura 6A, Tabla 2). Se identificaron niveles elevados de sCD163 en orina (por encima del límite de 0,3 ng/mmol de creatinina) en un pequeño número de pacientes críticos de la unidad de cuidados intensivos, dando positivo el 6,3 % de los pacientes con sepsis y lesión renal aguda (LRA), el 14,7 % de los pacientes con LRA, pero sin sepsis, y el 7,8 % de los pacientes sin LRA ni sepsis. El sCD163 en orina no resultó estar significativamente elevado en una cohorte de controles con enfermedad sin glomerulonefritis (n = 54) o en controles sanos (n = 55). Sin embargo, una cuarta parte de los controles con enfermedad con glomerulonefritis no vasculítica, en quienes cabría esperar grados variables de infiltración de macrófagos, tuvo un nivel elevado (n = 30).

El sCD163 en orina es un biomarcador significativamente mejor para la vasculitis renal activa que la tasa de excreción de proteína en orina

Usando las cohortes de validación interna, se probó la utilidad de sCD163 en orina en la identificación de la vasculitis renal activa frente a la proporción de proteína:creatinina en orina (PPC), usando un límite de PPC de 15 mg/mmol (Tabla 5). Por sí mismo, el sCD163 en orina fue superior en todas las medidas de rendimiento biomarcador, incluyendo la sensibilidad y la especificidad, que actúa como una medida de la tasa de falsos positivos. La combinación de sCD163 en orina con la PPC en orina no proporcionó una mejora estadísticamente significativa en el rendimiento biomarcador frente al uso de sCD163 solo. En un pequeño subconjunto de individuos para los que se obtuvieron muestras de un nuevo brote renal confirmado histológicamente, se comparó la precisión del biomarcador de sCD163 en orina, proteína reactiva C, la hematuria y el título de ANCA (Tabla 6). El sCD163 en orina fue superior a los otros tres biomarcadores en todas las medidas del rendimiento biomarcador.

Tabla 5. Comparación del rendimiento biomarcador de sCD163 en orina con PPC en orina y combinación de sCD163/PPC para diferenciar la vasculitis renal activa de la vasculitis renal en remisión. Las estadísticas se determinaron analizando los datos de un subconjunto de casos de la cohorte combinada. La prueba Bootstrap comparó la AUC de sCD163 y la PPC (*). AUC = área bajo la curva ROC, PPC = Proporción de Proteína/Creatinina, VPP = Valor Predictivo Positivo, VPN = Valor Predictivo Negativo, CVP = Coeficiente de Verosimilitud Positivo, CVN = Coeficiente de Verosimilitud Negativo.

	AUC	Límite	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	CVP	CVN
sCD163 normalizado	0,91	0,3	0,83	0,97	0,89	0,95	30,6	0,17
PPC	0,68	15	0,97	0,39	0,3	0,97	1,6	0,08
PPC sCD163+	0,93		0,8	0,97	0,89	0,95	29,33	0,21
Valor p de prueba Bootstrap	0,07							

Tabla 6. Comparación del rendimiento biomarcador de sCD163 en orina con PPC, análisis de orina y ANCA para diferenciar el brote renal probado por biopsia de la remisión. Los 4 biomarcadores en cuestión se compararon en cuanto a su capacidad para identificar a aquellos con un brote renal probado por biopsia (n = 7), teniendo todos ellos nivel elevado de sCD163 en orina. En el subconjunto de pacientes que padecían un brote probado por biopsia (n = 7) *o que pasaron a positivo habiendo dado negativo. VPP/VPN = valor predictivo positivo y negativo

	Precisión (intervalo del 95 %)	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
sCD163 normalizado > 0,3	0,97 (0,83 - 1)	1	0,96	0,88	1
PPC > 5	0,65 (0,45 - 0,81)	1	0,54	0,39	1
Hematuria nueva/aumentada	0,87 (0,7 - 0,96)	0,43	1	1	0,86
Elevación de >4 veces en el nivel de ANCA*	0,84 (0,66 - 0,95)	0,57	0,92	0,67	0,88

Los niveles de sCD163 en orina disminuyen con la inducción de la remisión

Para evaluar el curso temporal de la excreción urinaria de sCD163, se midió el nivel secuencialmente en un subconjunto de sujetos en varios puntos de tiempo después presentarse con la enfermedad activa (Figura 5E). En los pacientes con vasculitis renal activa, el nivel cayó rápidamente con el tratamiento y se mantuvo bajo. En aquellos con vasculitis extrarrenal activa, el nivel se mantuvo bajo en todos los puntos de tiempo.

Evaluación de la utilidad de sCD163 en orina en el seguimiento de la inflamación glomerular durante el tratamiento de inducción para la GNS

Criterios de inclusión: Pacientes tratados por GNS de novo o recidivante con corticosteroides más ciclofosfamida oral

diaria, ciclofosfamida intravenosa pulsada o rituximab. Estos pacientes pueden tener vasculitis con ANCA, enfermedad anti-GBM o nefritis lúpica. La mayoría tendrá vasculitis con ANCA, pero la señal biológica será similar independientemente de la causa de la GNS. La glomerulonefritis debe ser probada por biopsia; en ausencia de pruebas histológicas, será aceptable una imagen clínica de GNPR (creatinina en suero de aumento rápido asociada con sangre y proteína en la tira reactiva de orina con pruebas serológicas positivas apropiadas). El objetivo es mejorar las medidas actuales para identificar cuándo cambiar de terapia de inducción a terapia de mantenimiento (hematuria y proteinuria, véase la Figura 2), que sigan mejorando mucho después del punto en el que se realiza este cambio convencionalmente.

Criterio de exclusión: Anuric. Se incluirán los pacientes en diálisis que orinan.

10 Lecturas: Mediana e intervalo intercuartil de sCD163 en orina en el momento del diagnóstico, antes de cada dosis de ciclofosfamida o a intervalos mensuales después del tratamiento con rituximab/durante el tratamiento con ciclofosfamida oral, en el momento del cambio al tratamiento de mantenimiento y un año después de la inscripción (9-15 muestras por sujeto). El tiempo actuarial hasta el nadir de sCD163 en orina se estimará usando un análisis de la supervivencia.

15 Comparadores: Se tomarán muestras al mismo tiempo para la estimación de la proporción de proteína:creatinina en orina (PPC), tira reactiva de orina para la creatinina en sangre y en suero; estos valores se compararán con el valor de sCD163 en orina en cada punto de tiempo. El área bajo la curva de sCD163 se correlacionará con la fracción semilunar inicial, cuando esté disponible, y con la TFGe inicial, según lo determinado por la ecuación de CKD-Epi [Michels, W. M., y col., "Performance of the Cockcroft-Gault, MDRD, and new CKD-EPI formulas in relation to GFR, age, and body size". *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. 5(6): pág. 1003-9]. El tiempo actuarial hasta el nadir de sCD163 se comparará con el tiempo hasta el nadir de proteinuria y el nivel de creatinina en suero, y el tiempo hasta la desaparición de la hematuria según la tira reactiva usando el análisis de regresión de Cox.

25 Se comparará el valor delta de la TFGe entre aquellos con un análisis de sCD163 en orina positivo en el momento de finalización de la terapia de inducción frente a aquellos con un análisis negativo, con el mismo análisis realizado para los biomarcadores comparadores adicionales. Un análisis similar usando sCD163 como variable continua lo correlacionará con el valor delta de la TFGe.

Se espera que los experimentos definan un intervalo de confianza del 95 % para el valor de sCD163 en orina en el transcurso del tratamiento de inducción para la GNS y permitan determinar el curso temporal de este biomarcador en comparación con la proteína en orina, la sangre en orina y la creatinina en suero.

30 Resultados de las mediciones de MCP-1

Se espera encontrar niveles elevados de MCP-1 en la orina, pero no en el suero de pacientes con vasculitis renal activa o persistente. También se espera encontrar niveles de MCP-1 en la orina que disminuyan con el tratamiento para la misma. Los niveles elevados de MCP-1 diferencian la vasculitis renal activa con una alta especificidad y sensibilidad.

35 Un biomarcador urinario que pueda identificar de manera fiable la vasculitis renal activa en pacientes ya diagnosticados con VVP reduciría la necesidad de biopsias renales costosas e invasivas. En este contexto, se han investigado varios biomarcadores proteicos como biomarcadores de la enfermedad activa en la vasculitis, incluyendo la glicoproteína ácida alfa-1, la molécula de lesión renal 1, la fractalkina, la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). sCD163 es una proteína altamente estable, convirtiéndose en un atractivo biomarcador clínico. En sangre entera, es estable durante 24 horas y 48 horas a temperatura ambiente y a 4 °C respectivamente, mientras que, en plasma, es estable durante semanas a 4 °C y durante varios años a -20 °C. De igual manera, en orina, se descubrió que sCD163 es estable durante al menos una semana a temperatura ambiente. Esta estabilidad significa que es poco probable que las variaciones en la extracción y el procesamiento de las muestras sean un factor determinante en el resultado del ensayo. Esto representa una ventaja significativa frente a MCP1, que se degrada rápidamente tras el almacenamiento bajo congelación y los ciclos de congelación y descongelación. MCP1 es producida activamente por células renales intrínsecas y leucocitos en respuesta a estímulos inflamatorios, produciendo la quimioatracción de los monocitos, células que probablemente expresen por sí mismas CD163. Por lo tanto, las mediciones de MCP-1 y sCD163 reflejan elementos sutilmente diferentes de un procedimiento similar; su uso en combinación puede aumentar aún más la precisión diagnóstica.

50 Las excelentes características biomarcadoras de sCD163 urinario en la identificación de la vasculitis renal activa, la disponibilidad de anticuerpos de detección de alta calidad y su estabilidad durante el almacenamiento de las muestras sugieren que este biomarcador se podría desarrollar ahora para uso clínico. La mayoría de los programas de desarrollo de biomarcadores se basan en paneles de proteínas o metabolitos; la capacidad de sCD163 en orina solo (o normalizado con respecto a la creatinina) para identificar la vasculitis renal activa sugiere que es ideal para el desarrollo como prueba de tira reactiva en el punto de atención sanitaria, y puede tener un uso adicional en el seguimiento de la respuesta a la terapia de inducción, permitiendo regímenes de tratamiento más personalizados y menos tóxicos, o permitiendo clasificar pacientes con lesión renal aguda no diferenciada en entornos en los que puede haber demora en la obtención del diagnóstico serológico o histológico.

En la memoria descriptiva, los términos "comprenden, comprende, comprendido y que comprende" o cualquier variación de los mismos y los términos "incluyen, incluye, incluido y que incluye" o cualquier variación de los mismos se consideran totalmente intercambiables, y todos deben tener la interpretación más amplia posible y viceversa.

5 La invención no se limita a las realizaciones descritas anteriormente en el presente documento, sino que puede variarse tanto estructural como detalladamente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un individuo con glomerulonefritis semilunar (GNS) activa, comprendiendo el procedimiento la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de CD 163 soluble (sCD 163) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia se correlaciona con el individuo que tiene GNS activa, en el que la muestra biológica es orina, y la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos anti-membrana basal glomerular (anti-GBM).
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa de analizar la muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, se correlaciona con el individuo que tiene GNS activa.
3. Un procedimiento de evaluación de si un individuo debe continuar recibiendo tratamiento para la GNS, comprendiendo el procedimiento la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de CD 163 soluble (sCD163) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia se correlaciona con el individuo que es adecuado para la continuación del tratamiento, en el que la muestra biológica es orina, y la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos anti-membrana basal glomerular (anti-GBM).
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además la etapa de analizar la muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, se correlaciona con que el individuo es adecuado para la continuación del tratamiento.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el tratamiento consiste en tratamiento con glucocorticoides y/o tratamiento inmunosupresor.
6. Un procedimiento de distinción del brote de GNS de otras causas de deterioro clínico en un individuo que se sabía que tenía GNS anteriormente, comprendiendo el procedimiento la etapa de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de CD 163 soluble (sCD163) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia se correlaciona con el individuo que padece un brote de GNS y no otras causas de deterioro clínico, en el que la muestra biológica es orina, y el brote de GNS está causado por vasculitis de vasos pequeños (con y sin la presencia de anticuerpos anti-citoplasma de los neutrófilos (ANCA)) o enfermedad de anticuerpos anti-membrana basal glomerular (anti-GBM).
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además la etapa de analizar la muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en el que un nivel elevado de MCP-1 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, en combinación con niveles elevados de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, se correlaciona con el individuo que padece un brote de GNS y no otras causas de deterioro clínico.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que las otras causas de deterioro clínico comprenden lesión renal isquémica, nefritis intersticial, deposición secundaria a la deposición de paraproteínas, toxicidad por fármacos, lesión tubular mioglobinúrica, malignidad, necrosis tubular aguda, infección de orina, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica o glomerulonefritis fibrilar.
9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la muestra de referencia es un individuo identificado con enfermedad renal no causada por la VVP, GNS activa aguda u otras formas de GNS.
10. Terapia con glucocorticoides o inmunosupresora para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo con glomerulonefritis semilunar (GNS) establecida o recurrencia de GNS, comprendiendo el procedimiento las etapas de analizar una muestra biológica obtenida del individuo para detectar la presencia de un nivel elevado de CD 163 soluble (sCD163) en comparación con los niveles en una muestra de referencia, identificar al individuo para el tratamiento si la muestra biológica muestra un nivel elevado de sCD163 en comparación con los niveles en una muestra de referencia, y tratar al individuo con una terapia de glucocorticoides y/o una terapia inmunosupresora,

- en el que la muestra biológica es orina,
la GNS está causada por vasculitis de vasos pequeños (VVP) o enfermedad de anticuerpos anti-membrana basal glomerular (anti-GBM),
el glucocorticoide es seleccionado entre prednisolona, metil-prednisolona, hidrocortisona o dexametasona, y
5 la terapia inmunosupresora se selecciona entre ciclofosfamida, rituximab, micofenolato de mofetilo, azatioprina o metotrexato.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de ensayo emplea un aparato de diagnóstico *in vitro* configurado para detectar un nivel elevado de un marcador seleccionado de sCD163, y opcionalmente MCP-1, en una muestra biológica, y en el que el procedimiento comprende una etapa de análisis de
10 la muestra biológica con el aparato de diagnóstico *in vitro*.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el aparato de diagnóstico *in vitro* comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un marcador de proteína seleccionado entre sCD163 y, opcionalmente, MCP-1 inmovilizado en un soporte, en el que el procedimiento comprende las etapas de
15 poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo en condiciones que permitan que se produzca una reacción de unión de proteína-anticuerpo o proteína-fragmento de anticuerpo inmuno-específica, y la detección de una reacción de unión de proteína-anticuerpo o proteína-fragmento de anticuerpo inmuno-específica.
13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el aparato de diagnóstico *in vitro* es seleccionado entre un kit de ELISA y un kit de tira reactiva.
14. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13, en el que el aparato de diagnóstico *in vitro* es un
20 kit de tira reactiva que comprende: una tira reactiva que tiene el anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a sCD163 y, opcionalmente, a MCP-1 inmovilizado encima; uno o más reactivos capaces de detectar la reacción de unión de proteína-anticuerpo o proteína-fragmento de anticuerpo inmuno-específica y emitir una señal detectable; y un dispositivo de correlación para correlacionar la señal detectable con un nivel elevado de sCD163 y, opcionalmente, de MCP-1.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la señal detectable es un cambio de color, y en
25 el que el dispositivo de correlación es una tabla de colores.

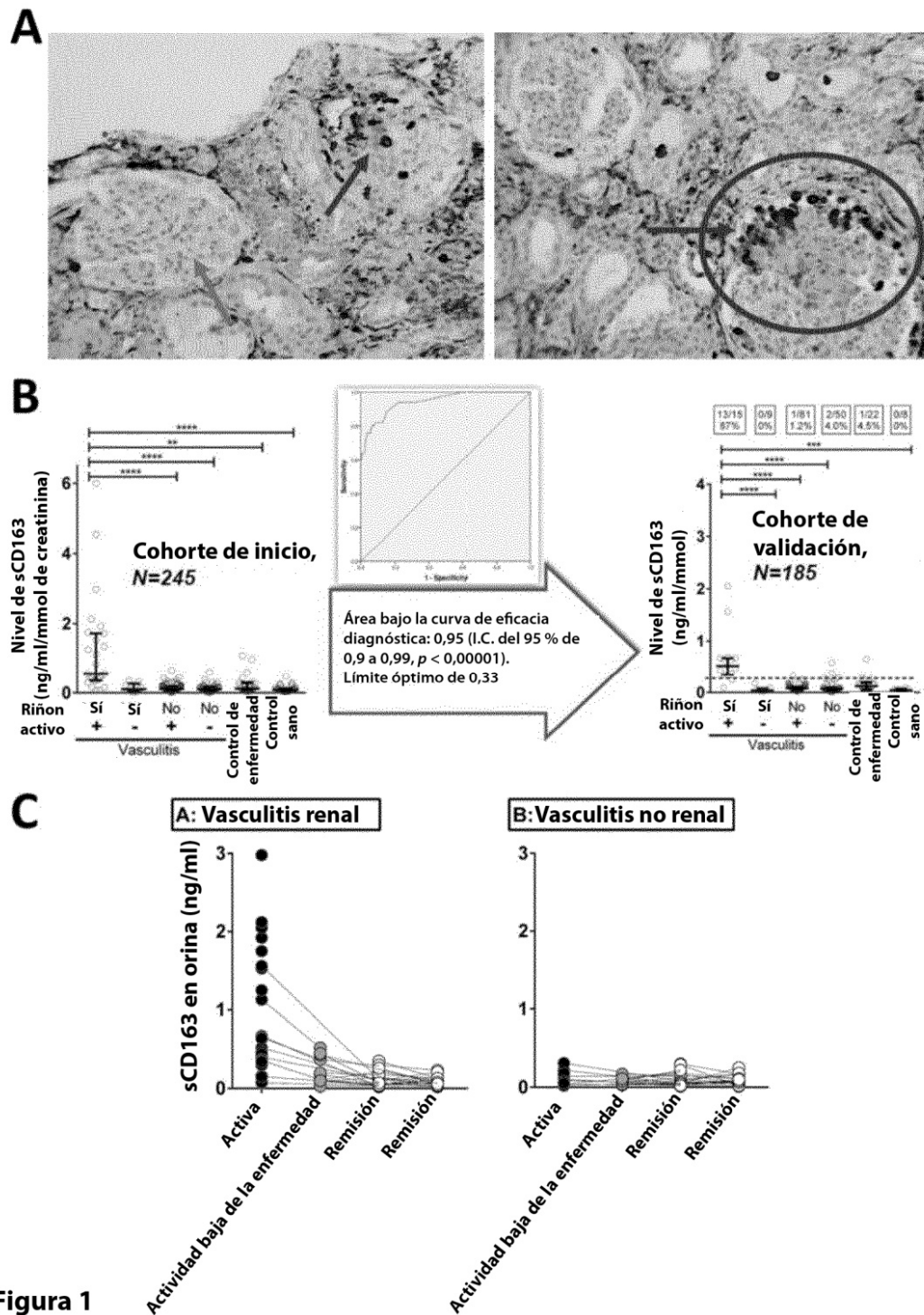


Figura 1

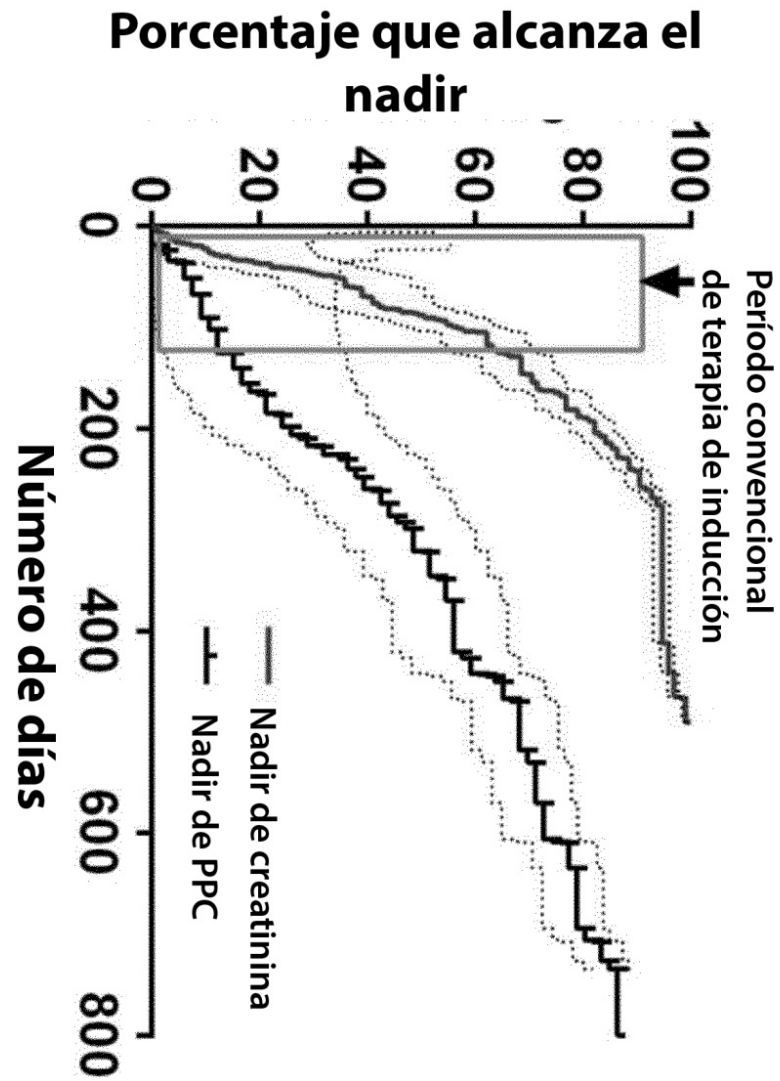


Figura 2

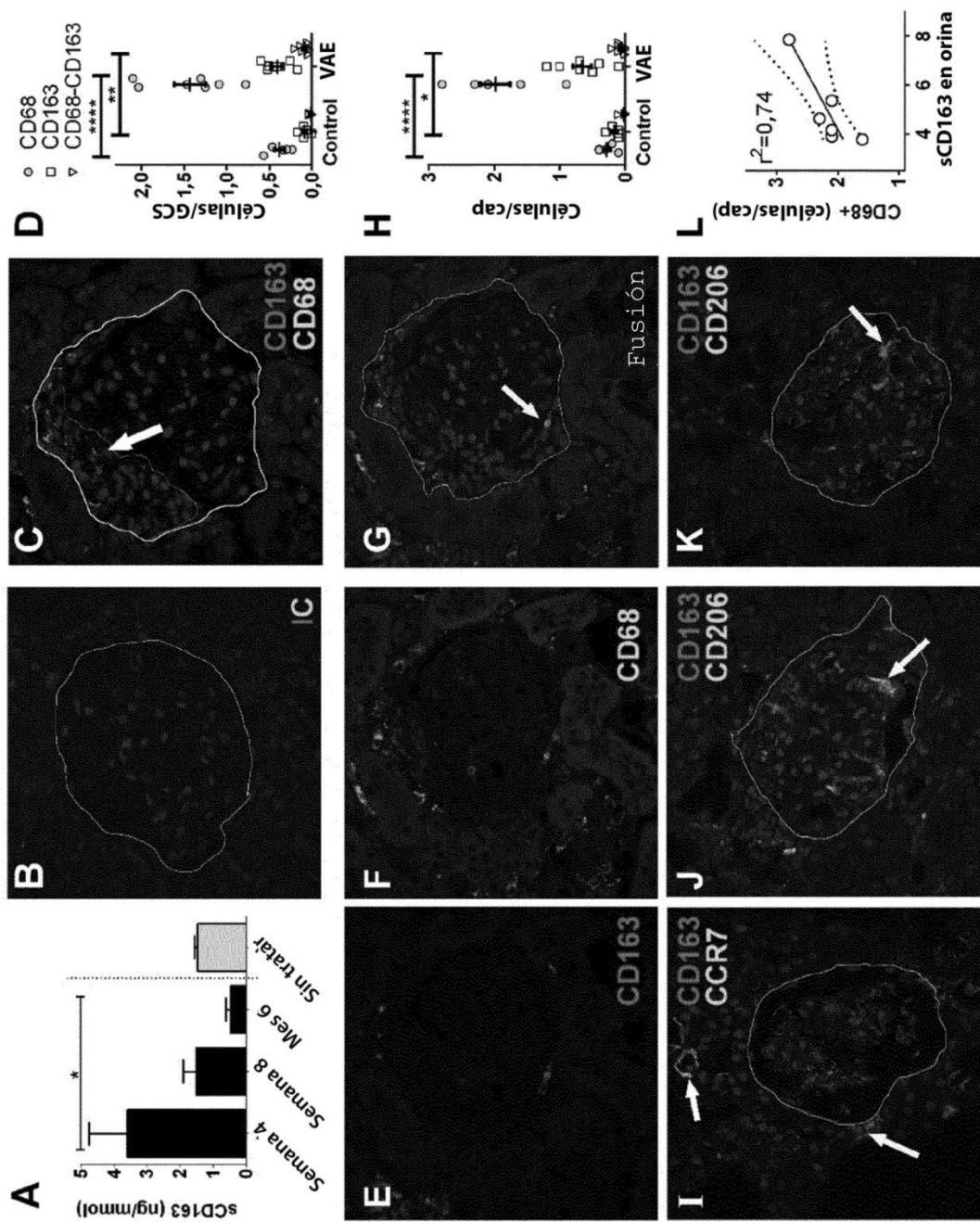


Figura 3

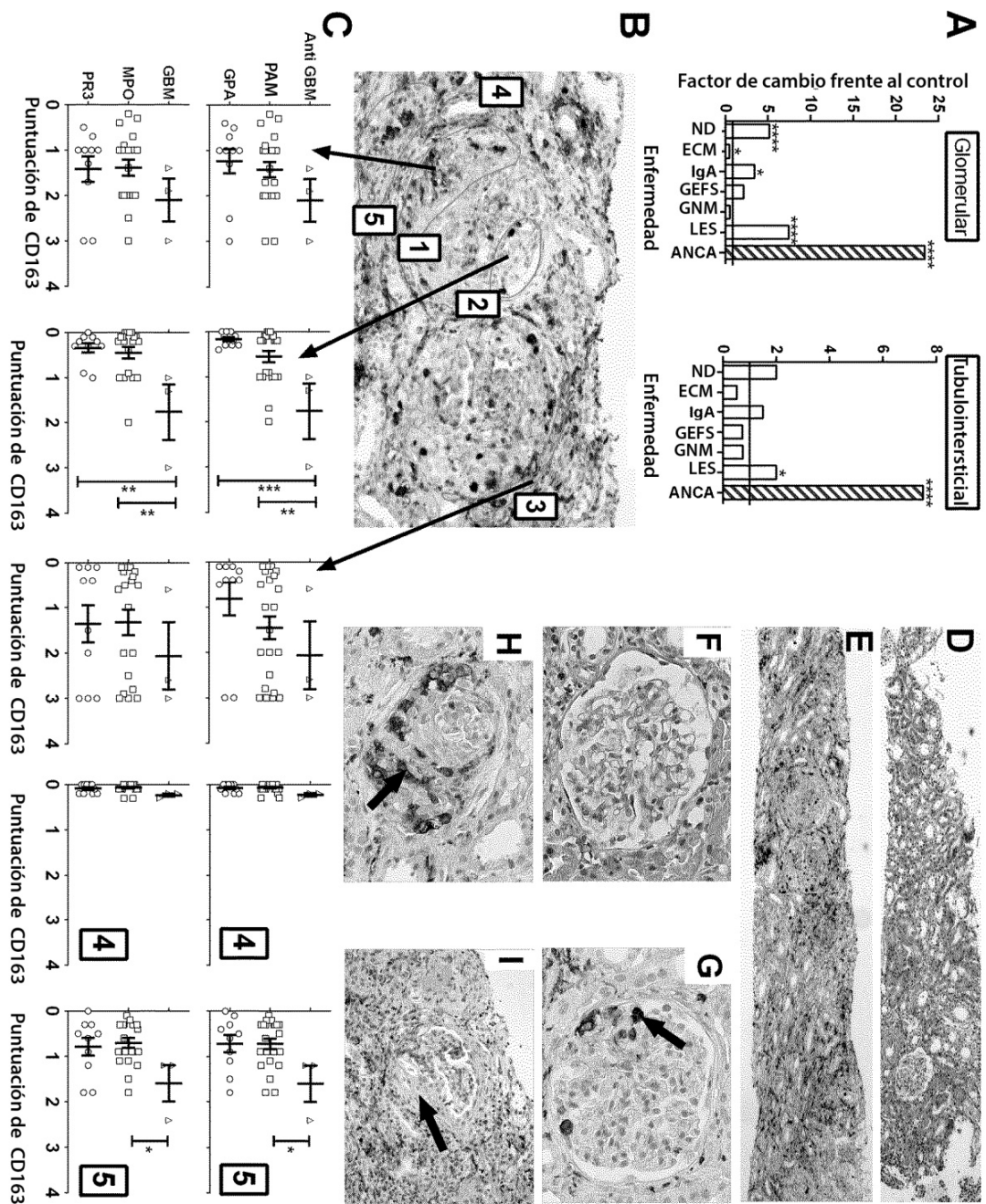


Figura 4

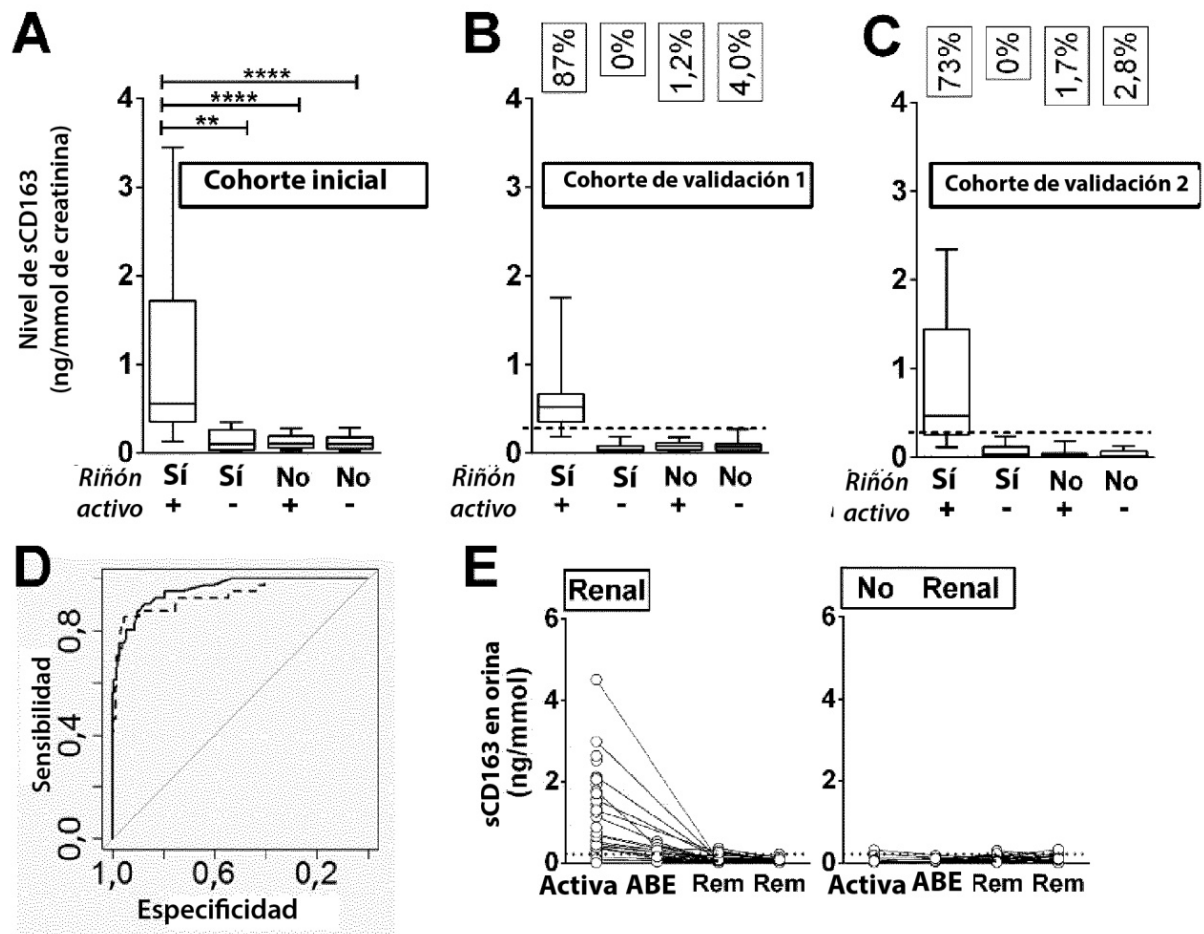


Figura 5

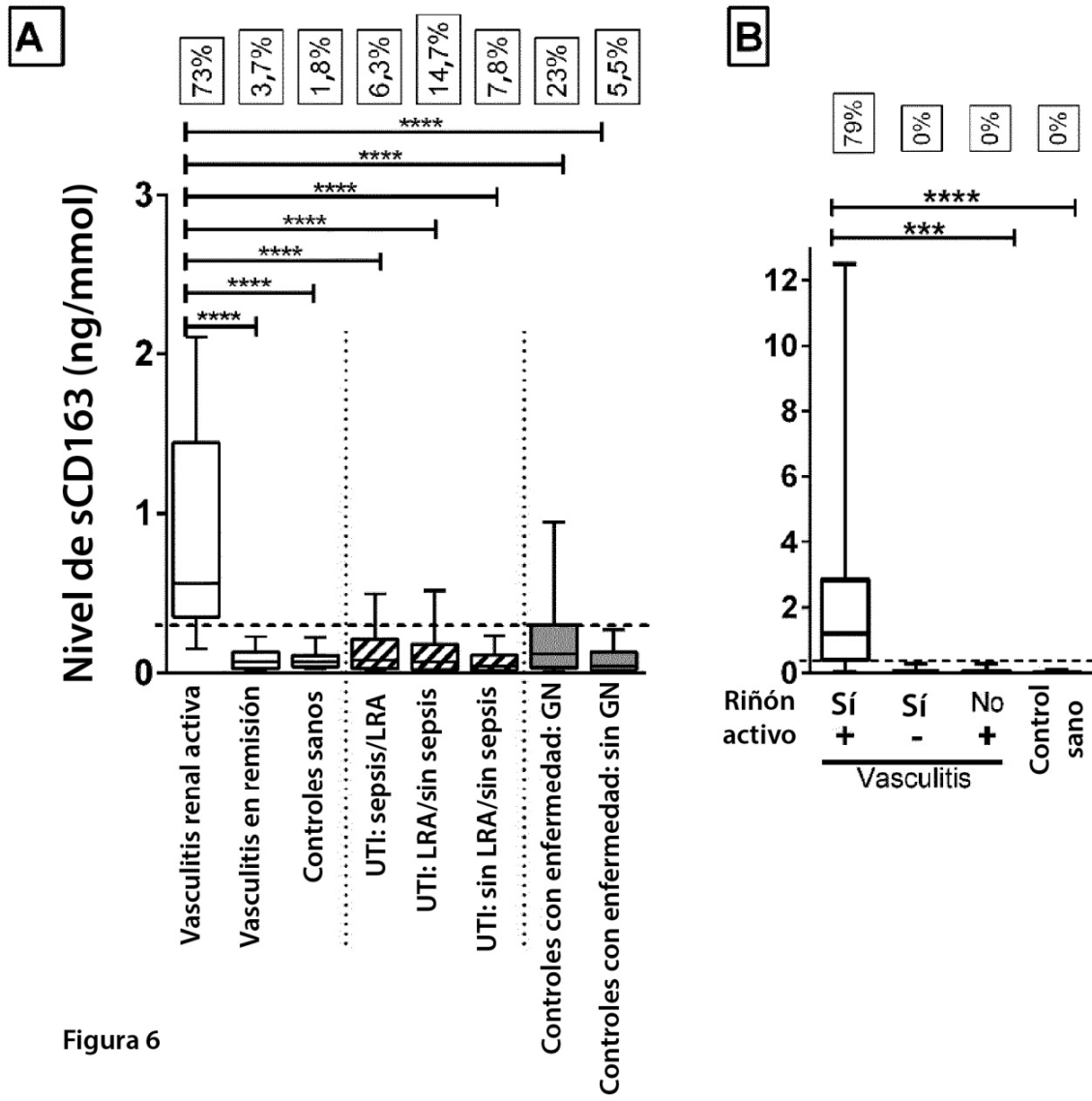


Figura 6

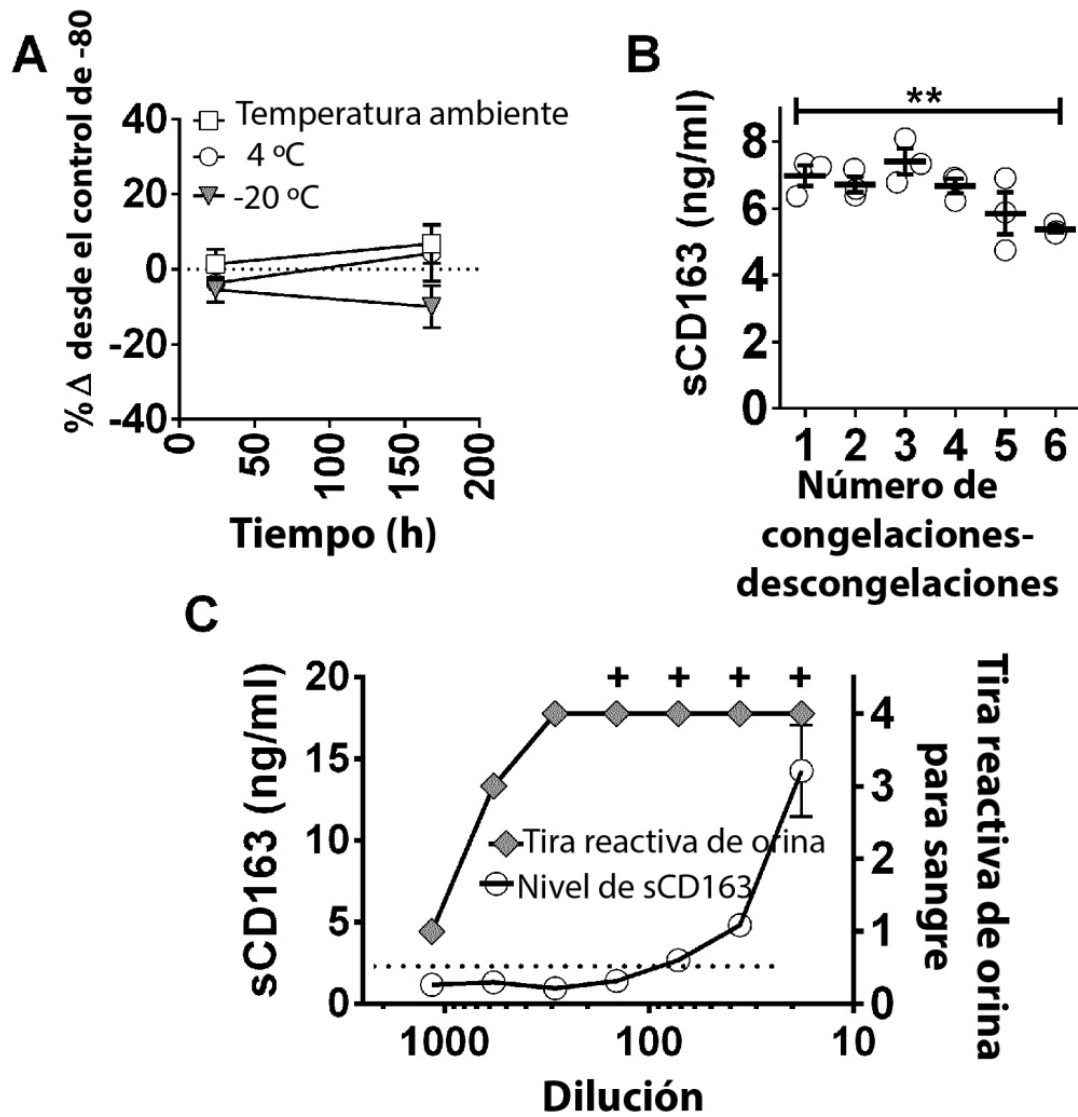


Figura 7

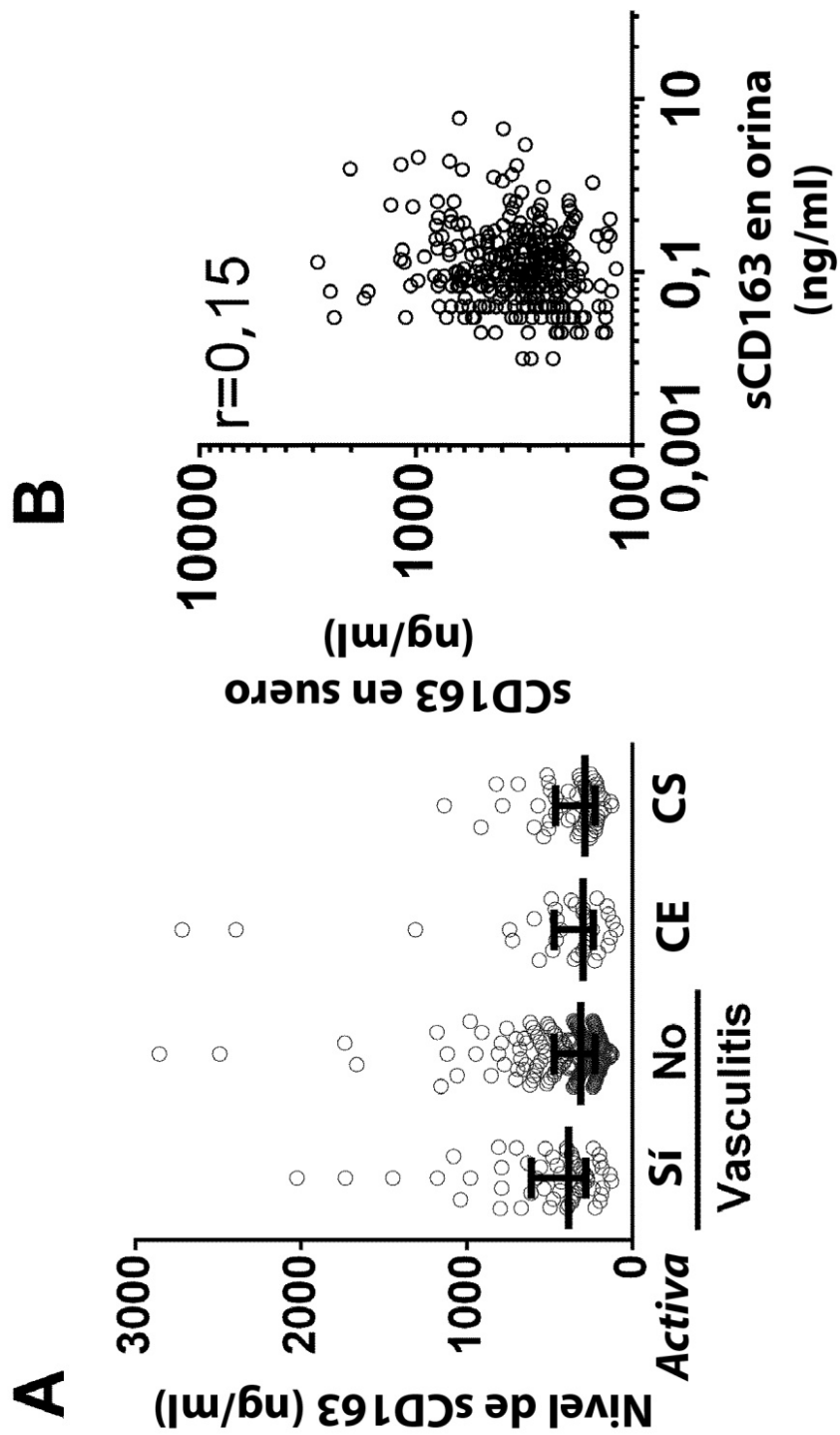


Figura 8

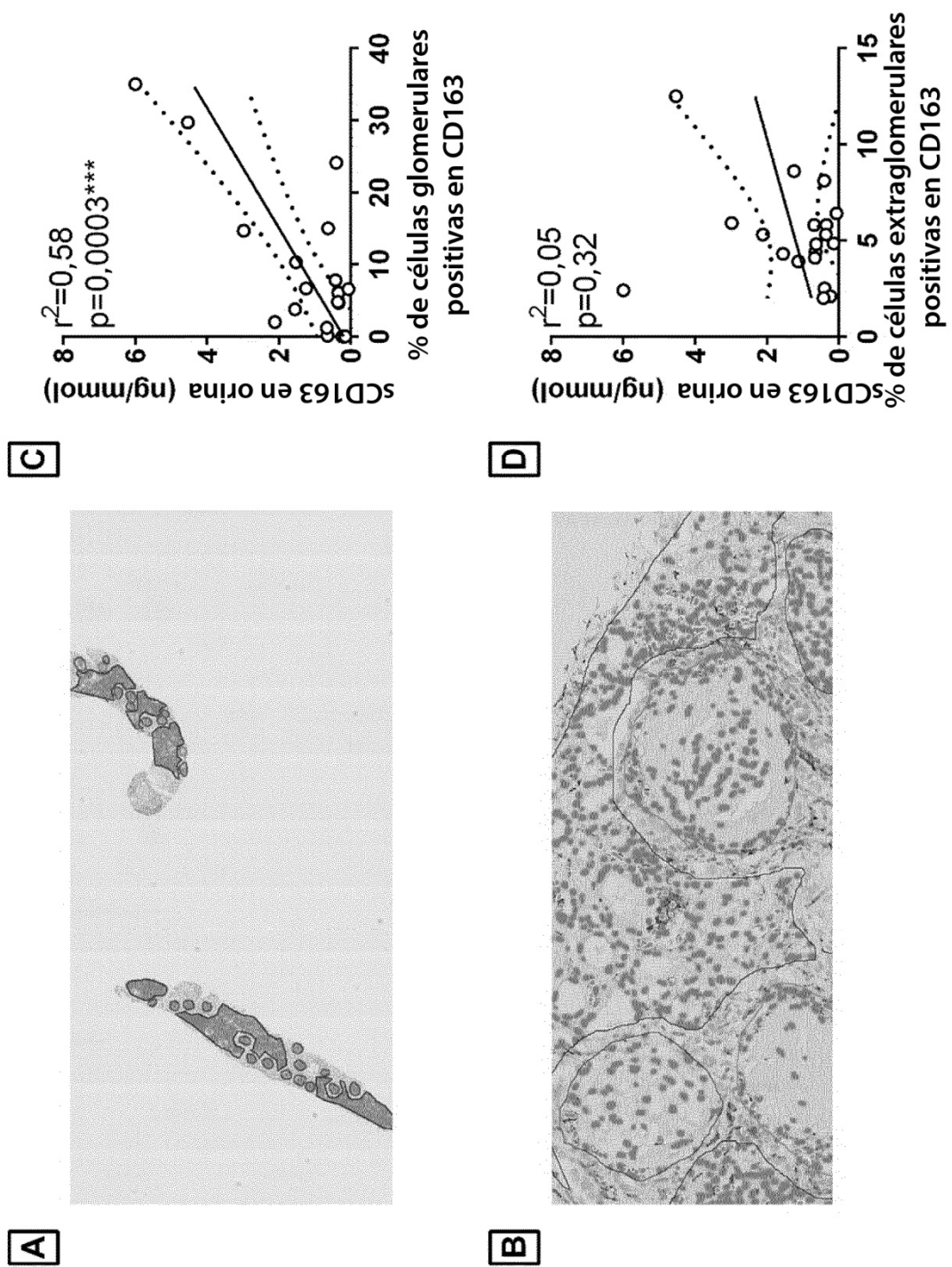


Figura 9

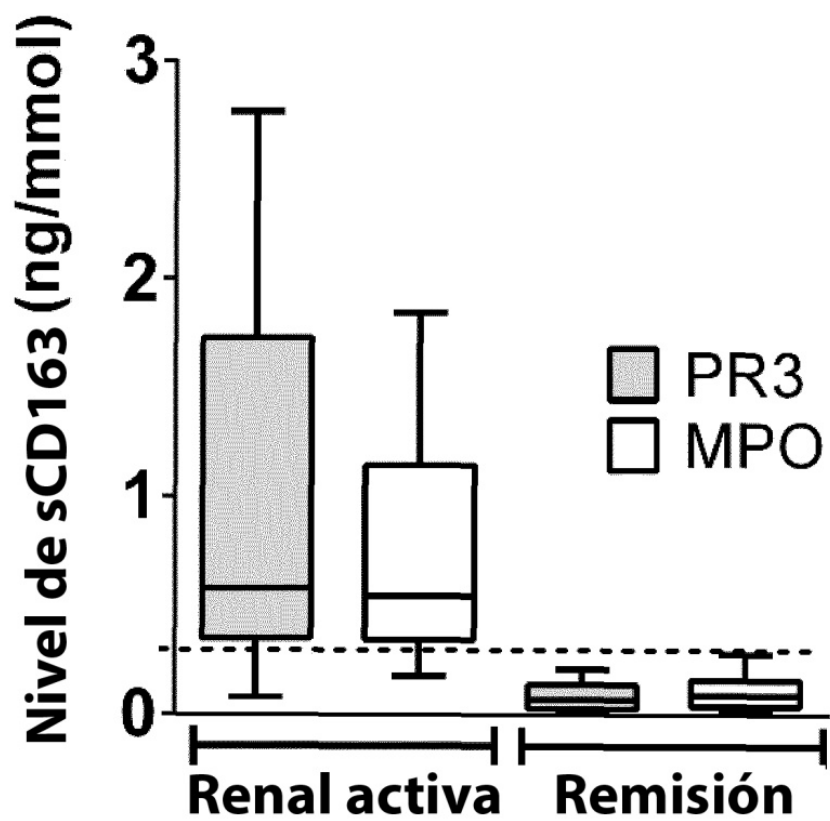


Figura 10

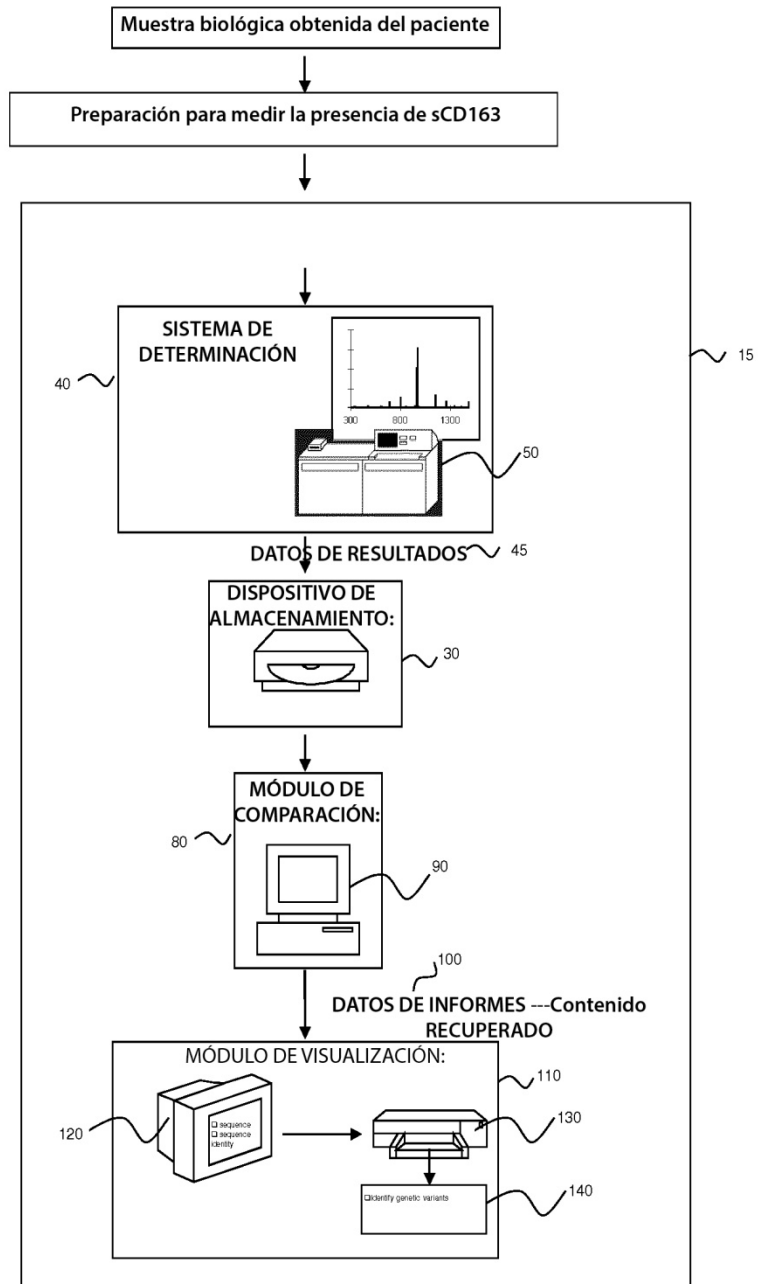


Figura 11