

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 091**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2000 E 05023845 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1624072**

54 Título: **Estuche para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII a partir de soluciones de proteínas**

30 Prioridad:

10.06.1999 DE 19926531

17.05.2000 DE 10023923

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

11.06.2014

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**RÖMISCH, JÜRGEN, DR.;
FEUSSNER, ANNETTE y
STÖHR, HANS-ARNOLD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 467 091 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

Estuche para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII a partir de soluciones de proteínas

5 Es objeto del invento un estuche para la determinación cualitativa y cuantitativa de la proteasa que activa al factor VII en unas complejas soluciones de proteínas tales como un plasma.

10 A partir de la solicitud de patente alemana 199 03 693.4 se conocen ya unos sistemas de ensayo y unos procedimientos para la detección cualitativa y cuantitativa de una proteasa, que activa al factor VII de coagulación de la sangre. Éstos comprenden unos procedimientos de ensayo cromogénicos, que se basan en la disociación de unos substratos peptídicos de bajo peso molecular marcados y en la determinación fotométrica de la extinción que aparece en este caso, en los que se aprovechan las propiedades biológicas de la mencionada proteasa. En este caso la proteasa o su proenzima pueden ser detectadas por el hecho de que ella

- 15 a) tiene un efecto desactivador de los factores VIII/VIIIa o V/Va de coagulación de la sangre o
- b) tiene un efecto abreviador de los tiempos de coagulación de la sangre en ensayos globales de coagulación o
- 20 c) tiene un efecto activador sobre los activadores del plasminógeno o
- d) tiene un efecto activador del FVII.

25 Sin embargo, la determinación de la actividad del activador del FVII conduce, en los casos de los procedimientos de determinación empleados hasta ahora, a unos resultados que son fiables solamente cuando la proteasa se presenta en el estado purificado o enriquecido, y ninguna influencia perturbadora de impurezas falsea los resultados de las mediciones. Especialmente unas mezclas muy complejas de proteínas tales como un plasma o unos líquidos tisulares, contienen ahora, no obstante, un gran número de proteínas, que impiden una determinación específica del activador del factor VII o que por lo menos pueden obstaculizarla. Además de ello, de acuerdo con el actual estado de los conocimientos, la proteasa se presenta en el plasma sobre todo en forma de una proenzima, de tal manera que es necesaria una activación para dar la proteasa activa con la finalidad de realizar la subsiguiente determinación de la actividad.

35 La proteasa que activa al factor VII es una proteína plasmática, que participa en la regulación de la hemóstasis, sobre todo mediante una cooperación en procesos de coagulación y fibrinólisis. Por lo tanto, la investigación de la función y de la actividad biológica de la proteasa presenta un alto interés. Así, por ejemplo, un contenido reducido de antígenos y/o una perturbación de la actividad biológica, causada por ejemplo por una mutación génica, podría indicar un riesgo aumentado de trombosis. Por lo tanto, se planteó la misión de desarrollar un procedimiento, que haga posible una determinación lo más sencilla y específica que sea posible de una o varias actividades biológicas de la proteasa que activa al factor VII. Puesto que la misión fisiológica de esta proteasa todavía no ha sido esclarecida, este método debería permitir en principio la determinación de varias actividades.

45 Por fin, se encontró que estos requisitos son satisfechos por medio de un procedimiento para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre en soluciones de proteínas, en el que

- la solución de proteínas que contiene la proteasa y/o su proenzima, es incubada con una fase sólida, con la que se había acoplado previamente un anticuerpo dirigido contra la proteasa y
- 50 - después de haber separado por lavado la fase sólida, la proteasa y/o su proenzima fijada(s) a ella es (son) incubada(s) con unos reactivos, que permiten la determinación de su actividad.

Este procedimiento de determinación se puede usar de manera sorprendente no sólo con la proteasa en su forma activada. A pesar de que los resultados de las investigaciones realizadas hasta ahora permiten sacar la conclusión de que la proteasa circula en el plasma predominantemente en forma de una proenzima, y que por lo tanto era de esperar que ésta, después de una fijación a la fase sólida arriba mencionada, en primer lugar todavía tiene que ser activada para poder desarrollar después de ello sus actividades biológicas, se encontró por fin de manera sorprendente que no es necesaria una tal activación, sino que la proenzima fijada a la fase sólida a partir del plasma desarrolla su actividad biológica en la forma inmovilizada de igual manera que la enzima activa. De esta manera es superflua una etapa separada de activación y se hace posible una determinación muchísimo más rápida y más exenta de perturbaciones.

Una activación específica de la proenzima se puede hacer seguir sin embargo absolutamente con el fin de asegurar que la proenzima fijada hubiera sido activada completamente.

65 Como fase sólida entran en cuestión las matrices conocidas para un experto en la especialidad tales como un Sepharose® o Fractogel® activado. De manera preferida, unas placas de microtitulación se revisten con unos

anticuerpos dirigidos contra la proteasa, que pueden ser de procedencia policlonal o monoclonal. También se pueden utilizar unos fragmentos de anticuerpos tales como un F(ab) o F(ab)₂. Al contrario que el ensayo con antígenos, en el que se utiliza un segundo anticuerpo marcado para la detección y luego también para la cuantificación, conforme al invento se añaden unos substratos cromogénicos, que permiten la determinación de la actividad de la proteasa. Un substrato cromogénico especialmente preferido es el S2288 de Chromogenix AB (H-D-iso-leucil-L-prolil-L-arginina-pNA x 2 HCl), que, al igual que unos compuestos similares, muestra un significativo aumento de la absorción, que es dependiente de la concentración y del tiempo, por medio de una amidólisis del substrato. Sorprendentemente, la proteasa conserva sus actividades biológicas y sus propiedades también después de una fijación a los anticuerpos, a saber la capacidad de activar al FVII y a los activadores del plasminógeno. De esta manera se hace posible la determinación específica de la funcionalidad de la proteasa a partir de una compleja solución de proteínas.

Junto a los substratos cromogénicos, también se proponen los demás substratos que se mencionan en la solicitud de patente alemana 199 03 693.4 para la determinación de una actividad, por lo tanto la desactivación de los factores VIII/VIIIa o V/Va de coagulación de la sangre y también la activación del FVII y de los activadores del plasminógeno. En este caso, por ejemplo, la proporción del factor VII que ha sido activada de esta manera puede ser determinada mediante una amidólisis directa de un substrato cromogénico específico para el FVII o mediante una reacción acoplada tal como el denominado ensayo de FVIIa-rTF. La activación de unos activadores del plasminógeno monocatenarios scuPA (acrónimo del inglés "single chain urokinase plasminogen activator" = activador del plasminógeno monocatenario del tipo de la urocinasa) o del sctPA (acrónimo del inglés "single chain tissue plasminogen activator" = activador tisular del plasminógeno monocatenario) se puede seguir fácilmente mediante la conversión química del substrato de, por ejemplo, el S2444 (piroGlu-Gly-Arg-pNA x HCl). Tal como se describe en la solicitud de patente alemana 199 03 693.4, para la detección se pueden añadir también unas sustancias, que estimulan a la actividad de la proteasa, por ejemplo, unas sales solubles de calcio y/o heparina o unas sustancias emparentadas con la heparina, tales como un sulfato de dextrano.

Otras investigaciones de soluciones, líquidos corporales y extractos de células o respectivamente de tejidos, con ayuda del procedimiento descrito, mostraron su idoneidad para la detección o respectivamente cuantificación de la proteasa que activa al FVII. Por este concepto se han de entender también las soluciones que contienen esta proteasa, tales como compuestos intermedios de la preparación previa de la proteasa, materiales sobrenadantes de los cultivos de células que resultan también en el caso de la fermentación de unas correspondientes células para la expresión recombinante. Por este concepto se han de entender también unas soluciones que resultan en el caso de la producción transgénica de la proteasa o respectivamente de la proenzima, tales como la leche.

Además de esto, el procedimiento se adecua para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al FVII en unos extractos de tejidos o células, que proporciona una impresión acerca de la presencia de la actividad de proteasa o respectivamente acerca de unos potenciales estados patológicos en el caso de una sobre- o infraexpresión de esta proteína.

Le corresponde un interés especial a la detección de las actividades de proteasas en ciertos líquidos corporales, tales como la sangre y el plasma, el plasma seminal, la orina, el líquido cerebroespinal o cefalorraquídeo, el líquido de lavado bronquioalveolar, el líquido amniótico, la saliva o el líquido lagrimal. Un valioso complemento al ensayo de actividad lo constituye en este caso el sistema de determinación de antígenos (p.ej. un ELISA) que se menciona en la solicitud de patente alemana 199 03 693.4, puesto que con ayuda de ambos parámetros se puede obtener un cuadro más completo, por ejemplo en el caso de una enfermedad.

En el caso de la investigación de unos donantes de sangre sanos llamó la atención el hecho de que aproximadamente un 5-10 % de los plasmas investigados tenía una actividad de proteasa manifiestamente más pequeña (aproximadamente en un 30-50 % del "valor promedio") en comparación con un patrón (unos plasmas agrupados), tal como se expone más detalladamente en el Ejemplo 1. Esta información fue complementada por el hecho de que casi todos estos donantes tenían unos contenidos de antígenos que se encontraban en la región normal. Este hecho podría apuntar por ejemplo a la existencia de una(s) mutación (mutaciones) (heterocigótica(s), que influiría(n) de un modo correspondiente sobre la actividad, pero no al contenido de antígeno, de una muestra de plasma. Como consecuencia de esto, estos donantes podrían constituir un grupo de riesgo para determinadas enfermedades y entonces se podrían adoptar eventualmente de manera precoz unas medidas profilácticas. Esto es válido para unas personas, que tienen unos niveles ltanto elevados como también reducidos de la actividad. Nosotros habíamos encontrado unas actividades significativamente aumentadas de esta proteasa (por ejemplo, en el caso de un contenido de antígeno normal o ligeramente aumentado) en los plasmas de unos pacientes con infartos cardíacos (véase también el Ejemplo 2) y con unas anginas de pecho estables e inestables, en comparación con un colectivo de pacientes sanos. Hasta ahora no se ha esclarecido si una elevación de la actividad de proteasa se puede evaluar como una causa de esta enfermedad, o si ésta corresponde más bien a una reacción antagónica del cuerpo, en el sentido de una trombolisis aumentada. Dejando aparte a la relevancia fisiológica de las elevadas actividades de proteasas, este parámetro puede ser utilizado para el reconocimiento precoz y como un criterio acerca de una modificación del cuadro patológico. Esto incluye el diagnóstico de otras complicaciones asociadas con el corazón y la circulación sanguínea.

Más allá de estas indicaciones, el sistema de ensayo descrito (también en combinación con una determinación de antígenos) se puede utilizar para el diagnóstico y el seguimiento de una terapia también en el caso de enfermedades malignas, inflamaciones, enfermedades autoinmunitarias, vasculitis, defectos respiratorios o respectivamente para el diagnóstico de una hemostasis (coagulación y fibrinólisis), así como también en el caso de una sepsis y de unas reacciones asociadas, tales como la coagulación intravascular diseminada. Otros sectores de uso comprenden el diagnóstico de defectos de órganos, tales como unas enfermedades cerebrales, respiratorias y renales. En pacientes con una cirrosis hepática, nosotros habíamos encontrado unas actividades significativamente disminuidas de la proteasa, que iban acompañadas en la mayoría de los casos de unos niveles de antígenos disminuidos.

Otras investigaciones mostraron que, junto a un aumento moderado del nivel de antígeno en el plasma de mujeres embarazadas sanas, se puede observar un manifiesto aumento de la actividad de proteasa en el transcurso de embarazos, presentándose los valores más altos en el tercer trimestre. Una ausencia de un tal aumento de la proteasa puede estar vinculada con un riesgo para la madre y el niño durante el embarazo, tal como el de unas complicaciones tromboembólicas, etc., hasta llegar a un parto prematuro y a un aborto o a una malformación del feto.

El invento es ilustrado mediante los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1

Unas placas de microtitulación (de 96 pocillos) fueron revestidas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el activador del factor FVII, mediante el recurso de que en cada pocillo se pipetearon 150 µl de una solución que contenía 10 µg/ml. Después de una incubación durante 16 horas a la temperatura ambiente, la placa se lavó varias veces. En los pocillos se pipetearon en cada caso 100 µl de unas concentraciones crecientes de una proteasa purificada o respectivamente de diferentes diluciones de un plasma humano patrón (SHPL acrónimo de Standard Human Plasma). Después de una incubación a 37°C, las soluciones se retiraron mediante un lavado repetido varias veces y se determinaron las actividades.

En cada pocillo se pipetearon 50 µl de una solución de prourocinasa (10 µg/ml, de American Diagnostica, EE.UU.), así como 50 µl de un tampón, que contenía CaCl₂ 30 mM y 100 UI/ml (unidades internacionales por mililitro) de heparina. Dos minutos más tarde, se añadieron otros 100 µl del tampón y 25 µl del sustrato S2444 (3 mM). Se determinó el aumento de la absorción a 405 nm por minuto.

Proteasa, purificada (µg/ml)	Δ mDO/min	SHPL (dilución)	Δ mDO/min
0	0,4	tampón	0,4
0,1	7	1:200	0,4
0,2	12	1:100	0,9
0,4	18	1:50	7,5
0,6	22	1:33,3	8,4
0,8	24	1:25	15,2
1,0	27	1:20	24,8
2,0	34	1:10	31,2

DO = acrónimo de "densidad óptica"

Ejemplo 2

El revestimiento de las placas de microtitulación y la incubación con las soluciones de muestra se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. En lugar de la activación de la prourocinasa, se determinó la activación del factor VII. Para esto, en los pocillos de la placa se vertieron en cada caso 50 µl de un tampón, que contenía CaCl₂ 30 mM y 100 UI/ml de heparina, durante 2 minutos, a la temperatura ambiente. Después de la adición de otros 100 µl del tampón y de 25 µl de Spectrozym® VIIa (3 mM, de American Diagnostica/EE.UU.), se determinó la Δ mDO/min.

Proteasa, purificada (µg/ml)	Δ mDO/min	SHPL (dilución)	Δ mDO/min
0	0,3	tampón	0,3
0,2	1,8	1:100	0,3
0,4	2,8	1:50	0,3
0,6	3,0	1:33,3	0,8
0,8	3,6	1:25	3,2
1,0	4,7	1:20	7,2
1,5	7,1	1:13,3	8,4
2,0	7,9	1:10	11,5

Con ayuda de estas series de diluciones es posible comparar unos plasmas individuales y determinar la funcionalidad de la proteasa. Mediante una comparación con un plasma humano patrón, que constituye una

agrupación (en inglés pool) de cientos de plasmas individuales, se pudieron detectar unas desviaciones significativas con respecto de la norma. La actividad determinada de esta manera debería idealmente ser puesta en relación con el contenido de antígeno, que se puede determinar por ejemplo mediante un ELISA.

- 5 Si se conoce la cantidad de la proteasa, entonces se puede determinar la actividad específica de la proteasa contenida en la solución de proteínas así como de su proenzima.

Ejemplo 3

10 Determinación de la actividad de proteasa en 190 plasmas de donantes sanos

15 190 plasmas al citrato de personas sanas, siendo 140 de ellas varones y 50 de ellas hembras, se investigaron con ayuda del ensayo de actividad que se ha descrito. Para comprobar si unas actividades, que se desvían potencialmente del valor promedio de todos los plasmas investigados, iban acompañadas de una modificación correspondiente del nivel de antígenos de la proteasa, se utilizó un ELISA, tal como se ha descrito en la solicitud de patente alemana 199 03 693.4. Un tal ELISA para la detección de la proteasa como antígeno es realizable con ayuda de anticuerpos específicos monoclonales o policlonales dirigidos contra esta proteasa.

20 **La Figura (1)** muestra las actividades de proteasa de los varones sanos investigados (A) y de las hembras sanas investigadas (B). Se pone de manifiesto que un 5-10 %, tanto de los varones como también de las hembras, tenían una actividad manifiestamente disminuida en comparación con el valor promedio.

25 Las actividades de proteasas (eje de y = de las ordenadas) y los niveles de antígenos pertenecientes a éstas de las correspondientes personas (eje de x = de las abscisas) se han representado en la Figura. Las "regiones normales" arbitrarias de los niveles de antígenos y de las actividades se muestran respectivamente por medio de unas líneas horizontales y verticales como delimitaciones superiores e inferiores de los parámetros. Los rectángulos, que resultan de esto (en cada caso en el centro de la Figura), constituyen por consiguiente las "regiones normales" de los donantes sanos. En este caso, se muestra de nuevo, de una manera especialmente manifiesta, que la mayoría de las muestras con una actividad disminuida no estaban acompañadas por una correspondiente disminución del nivel de antígenos. Esto podría apuntar a la existencia de una (o varias) mutación (mutaciones) heterocigótica(s), es decir por ejemplo, que aproximadamente un 50 % de las moléculas de proteasas podrían haber sido modificadas por una o varias mutaciones de tal manera que ya no esté garantizada una reacción con substratos biológicos. En el caso de una importancia fibrinolítica de la proteasa, esto podría ir acompañado por un riesgo de trombosis (o de otras enfermedades, etc.) de esta población, que está actualmente todavía "sana". Si bien en la minoría de las muestras investigadas, los valores de la actividad reducida de la proteasa, que van acompañados muy ciertamente por un contenido disminuido de antígenos, deben de ser considerados como no menos interesantes, puesto que evidentemente se presenta una desregulación de la disponibilidad plasmática de la proteasa, que puede estar vinculada con un riesgo comparable, tal como se ha descrito.

40 Correspondientemente, la detección de la actividad de proteasa, también en unión con la determinación del antígeno, puede ser considerada como un parámetro para el reconocimiento precoz y el control de la profilaxis y de la terapia.

Ejemplo 4

45 Determinación de la actividad de proteasa en plasmas de mujeres embarazadas

50 Se ensayaron unos plasmas al citrato de mujeres embarazadas, tal como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se obtuvieron unas muestras en diferentes épocas del embarazo y éstas fueron investigadas seguidamente.

55 Las evoluciones de dos embarazos sin problemas se han representado en la Tabla 1. Se puede reconocer un manifiesto aumento de la actividad de proteasa en el transcurso del embarazo, mientras que, en contraposición a esto, los contenidos de antígenos de la proteasa no aumentan o solamente aumentan de una manera moderada. Una ausencia de esta actividad aumentada podría estar vinculada con ciertos problemas para la madre y el feto.

60 Las mujeres sanas (no embarazadas) muestran, por el contrario, una evolución continua de las actividades de proteasas (ni aumentadas ni disminuidas, dentro del marco de las fluctuaciones del ensayo) durante un correspondiente período de tiempo de observación (no representado).

Tabla 1

Los datos porcentuales se refieren a los valores promedios de mujeres sanas (no embarazadas).

Trimestre del embarazo	Antígeno (%) embarazadas		Actividad (%) embarazadas	
	1	2	1	2
I	103	105	110	115
II	118	123	158	176
III	126	143	215	280

Ejemplo 5

Determinación de la actividad de proteasa en plasmas procedentes de pacientes con infartos cardiacos

Unos plasmas de 54 pacientes con un infarto de miocardio agudo se obtuvieron al ingresar (antes de un tratamiento intensivo) en el servicio de urgencias y se utilizaron para la analítica rutinaria. Posteriormente, los restos de los plasmas (unas partes alícuotas no descongeladas) se utilizaron para la cuantificación de las actividades de proteasa (y de los contenidos de antígenos).

La **Figura (2)** recopila los resultados de la investigación. En comparación con un colectivo de donantes sanos (**B**), en los plasmas de unos pacientes con un infarto de miocardio agudo (**A**) se pueden medir unas actividades significativamente más altas de proteasas (y también de los contenidos de antígenos).

Correspondientemente, estos parámetros pueden ser utilizados para el reconocimiento precoz de un infarto, es decir, también en el caso de una angina de pecho estable e inestable. En los casos de unos pacientes con estas enfermedades cardiacas coronarias nosotros habíamos encontrado asimismo, en promedio, unas actividades significativamente aumentadas. La magnitud de los valores medidos puede hacer posible una valoración del grado de gravedad de la enfermedad o respectivamente, en el transcurso de una profilaxis y una terapia de un infarto y de una angina de pecho, puede proporcionar unas valiosas indicaciones acerca del estado del paciente. Además de ello, estos parámetros pueden ser utilizados para la evaluación de otras complicaciones asociadas con el sistema cardiovascular.

REIVINDICACIONES

1. Estuche para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre **caracterizado por que** están contenidos/as una fase sólida, con la que se había acoplado previamente un anticuerpo dirigido contra la proteasa, y un sustrato cromogénico, el factor VII, el factor VIII/VIIIa, el factor V/Va o unos activadores de plasminógeno, permitiendo el sustrato cromogénico una determinación de la actividad de la proteasa a través de un aumento de la absorción, que es dependiente de la concentración y del tiempo, mediante una amidólisis del sustrato.
2. Estuche para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado por que** el anticuerpo dirigido contra la proteasa es un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de anticuerpo F(ab) o F(ab)₂.
3. Estuche para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 2 **caracterizado por que** está contenida adicionalmente una sustancia que estimula a la actividad de la proteasa.
4. Estuche para la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizado por que** las sustancias que estimulan a la proteasa son unas sales solubles de calcio y/o heparina o unas sustancias emparentadas con la heparina tales como sulfato de dextrano.
5. Procedimiento para el reconocimiento precoz de un infarto o de una angina de pecho estable o inestable, **caracterizado por que** en una muestra de un líquido corporal se determina una actividad significativamente aumentada de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre en comparación con un colectivo de donantes sanos, efectuándose la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre mediante el recurso de que
- la muestra de un líquido corporal, que contiene la proteasa y/o su proenzima, se incuba con una fase sólida, con la que anteriormente se había acoplado un anticuerpo dirigido contra la proteasa y
 - después de la separación por lavado de la fase sólida, se incuba(n) la proteasa fijada a ella y/o su proenzima con unos reactivos, que permiten la determinación de su actividad.
6. Procedimiento para el reconocimiento precoz de un infarto o de una angina de pecho estable o inestable de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** se determina un contenido de un antígeno, aumentado significativamente, de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre.
7. Procedimiento para el diagnóstico de la evolución y/o del grado de gravedad de un infarto y/o del éxito de una profilaxis y/o de una terapia en el caso de una angina de pecho, **caracterizado por que** en una muestra de un líquido corporal se determina la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre, y la magnitud de los valores medidos proporciona unas indicaciones acerca del estado del paciente, efectuándose la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII mediante el recurso de que,
- la muestra de un líquido corporal que contiene la proteasa y/o su proenzima se incuba con una fase sólida, con la que previamente se había acoplado un anticuerpo dirigido contra la proteasa y
 - después de la separación por lavado de la fase sólida, se incuba(n) la proteasa fijada a ella y/o su proenzima con unos reactivos, que permiten la determinación de su actividad.
8. Procedimiento para la vigilancia de un embarazo, **caracterizado por que** en el transcurso del embarazo se determina un aumento de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre, efectuándose la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre en diversas épocas del embarazo mediante el recurso de que
- la muestra de un líquido corporal que contiene la proteasa y/o su proenzima se incuba con una fase sólida, con la que previamente se había acoplado un anticuerpo dirigido contra la proteasa y
 - después de la separación por lavado de la fase sólida, se incuba(n) la proteasa fijada a ella y/o su proenzima con unos reactivos, que permiten la determinación de su actividad.
9. Procedimiento para la vigilancia de un embarazo de acuerdo con la reivindicación 8 **caracterizado además por que** se determina un aumento moderado del contenido de antígeno de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre.
10. Procedimiento para el reconocimiento precoz de un riesgo de trombosis, **caracterizado por que** en una muestra de un líquido corporal se determina una actividad disminuida en comparación con el promedio de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre, efectuándose la determinación de la actividad de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre en diversas épocas del embarazo mediante el recurso de que

- la muestra de un líquido corporal que contiene la proteasa y/o su proenzima se incuba con una fase sólida, con la que anteriormente se había acoplado un anticuerpo dirigido contra la proteasa y
- después de la separación por lavado de la fase sólida, se incuba(n) la proteasa fijada a ella y/o su proenzima con unos reactivos, que permiten la determinación de su actividad.

5

11. Procedimiento para el reconocimiento precoz de un riesgo de trombosis de acuerdo con la reivindicación 10 **caracterizado** además **por que** se determina un contenido disminuido o normal del antígeno de la proteasa que activa al factor VII de coagulación de la sangre.

FIG.1

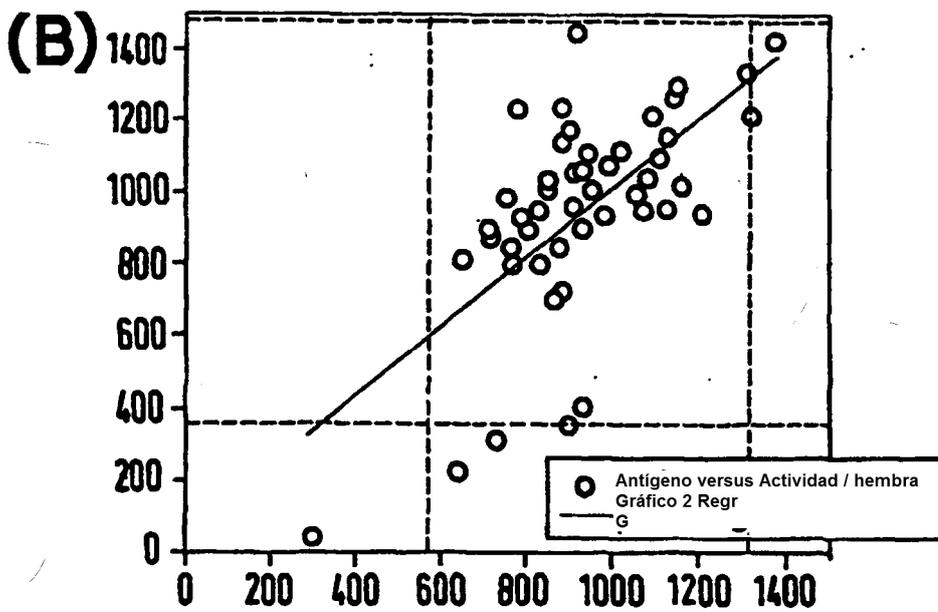
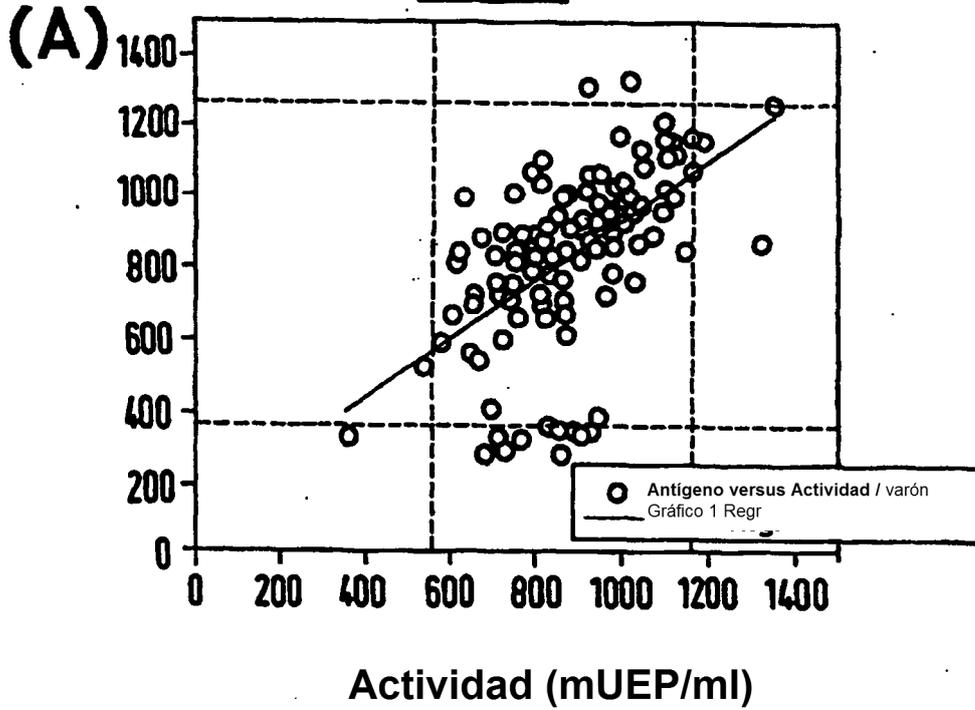


FIG.2

