

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 172**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/56** (2006.01)

**C12N 9/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/EP2012/071572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13064542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12786887 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2773756**

54 Título: **Método para la producción de trombina humana y sus usos**

30 Prioridad:

**04.11.2011 US 201161555763 P**

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

**19.09.2017**

73 Titular/es:

**ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
COOPERATIVA EN BIOMATERIALES - CIC  
BIOMAGUNE (100.0%)  
Parque Tecnológico de San Sebastián, Paseo  
Marimón, 182, Edificio Empresarial C  
20009 San Sebastián (Gipuzkoa), ES**

72 Inventor/es:

**PAVLOV, VALERY;  
SAA PEÑA, LAURA y  
VIREL SÁNCHEZ, ANA**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 633 172 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para la producción de trombina humana y sus usos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la biotecnología. Específicamente, la invención se refiere a una pretrombina-2 mutada recombinante estable que es capaz de convertirse ella misma autocatalíticamente en  $\alpha$ -trombina activa que puede usarse como hemostático. Otro aspecto de la invención incluye la aplicación de la pretrombina-2 recombinante mutada y la  $\alpha$ -trombina obtenida por su propia actividad autocatalítica, en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con la coagulación.

**Antecedentes de la invención**

15 La  $\alpha$ -trombina desempeña un papel importante en la hemostasia y, por tanto, es una proteína altamente útil para su uso como hemostático. Actualmente, la  $\alpha$ -trombina se utiliza en más de 1 000 000 de pacientes en los EE.UU. cada año [1]. La principal fuente de  $\alpha$ -trombina es el plasma humano recogido de donantes combinado. El plasma se trata mediante una filtración y una separación complicadas, sin embargo, ningún procedimiento es completamente eficaz contra las partículas virales derivadas de la sangre humana [2].

20 Como alternativa, puede producirse  $\alpha$ -trombina recombinante que está desprovista de los riesgos de las partículas virales. La trombina se sintetiza en forma de protrombina que es una de las enzimas proteolíticas que normalmente se sintetizan en su forma inactiva, conocidas como proenzimas o zimógenos, los cuales pueden escindirse por el factor Xa o por la ecarina, una proteasa que se encuentra en el veneno de serpiente, [3] en dos sitios, los enlaces Arg-Thr y Arg-Ile. La escisión en el primer sitio del factor Xa da como resultado pretrombina-2, un precursor monocatenario inactivo que tiene el mismo tamaño que la  $\alpha$ -trombina. La activación de la pretrombina-2 a  $\alpha$ -trombina se produce a través de la reordenación interna de la cadena peptídica inicial tras la escisión del enlace Arg-Ile con el factor Xa o por la ecarina [4]. La sección peptídica más corta escindida no sale de la macromolécula de  $\alpha$ -trombina, sino que permanece unida a la secuencia peptídica más larga a través de un enlace S-S.

30 Actualmente, es imposible expresar directamente  $\alpha$ -trombina recombinante activa a partir del fragmento del gen correspondiente a la protrombina debido a que la proteína resultante siempre será pretrombina-2 inactiva. La preparación de pretrombina-2 recombinante y su activación a  $\alpha$ -trombina por ecarina, se ha descrito en la bibliografía [5]. El principal inconveniente de este procedimiento es la necesidad de emplear ecarina extremadamente peligrosa, el reactivo principal en el veneno de la serpiente *Echis carinatus* [6], para activar la  $\alpha$ -trombina. La eliminación de la ecarina, disminuye significativamente el rendimiento y aumenta los costes de la preparación de la  $\alpha$ -trombina. Aún así, no hay seguridad del 100 % de que la  $\alpha$ -trombina recombinante no esté contaminada con ecarina. Puede utilizarse factor Xa en lugar de ecarina mortal, pero requiere para su funcionamiento óptimo un complejo con el factor V, fosfolípidos de las plaquetas y calcio [7], que también deben separarse de la  $\alpha$ -trombina.

40 Por otro lado, las enzimas, tales como la  $\alpha$ -trombina se han usado frecuentemente en diferentes ensayos bioanalíticos para la detección y la amplificación de la señal. Se emplean en la cuantificación de glucosa [8], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [9], pesticidas [10], colesterol [11] y etanol [12] y son la base para los ensayos ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas) [13]. Se han utilizado técnicas de amplificación enzimática [14] para mejorar la sensibilidad de varios ensayos bioanalíticos. En este sentido, el estado de la técnica desvela un ensayo que incluye una cascada de amplificación doble en la que la ecarina convirtió la protrombina en  $\alpha$ -trombina para digerir un sustrato fluorógeno artificial [15]. Como se ha mencionado anteriormente, la protrombina es una de las enzimas proteolíticas que normalmente se sintetizan en su forma inactiva, conocidas como proenzimas o zimógenos [16]. Cuando el producto de la reacción de escisión de la proenzima cataliza la misma reacción, el proceso se denomina activación autocatalítica. Algunos ejemplos de enzimas autocatalíticas naturales son el tripsinógeno, el pepsinógeno o el factor XII de coagulación sanguínea. El comportamiento autocatalítico de estas enzimas se podría aplicar con fines analíticos. Además, se usan ensayos para determinar la actividad de la  $\alpha$ -trombina para evaluar la tasa de coagulación sanguínea, por tanto, es importante desarrollar métodos sensibles para controlar su actividad.

55 La señal obtenida por una baja concentración de una enzima puede amplificarse considerablemente por medio de una reacción autocatalítica. El uso de zimógenos en bioanálisis es limitado, ya que todas las proenzimas autocatalíticas naturales conocidas son inestables *in vitro* y sus preparaciones siempre contienen trazas de las correspondientes enzimas activas [19]. Hasta donde sabemos, todavía no hay disponibles en el mercado kits basados en proenzimas autocatalíticas naturales. Anteriormente, los inventores usaron las máquinas de ADN auto-replicante basadas en endonucleasas para crear redes de amplificación de señal [20, 21]. Desafortunadamente, las máquinas de ADN no son estables en líquidos corporales y no pueden aplicarse para el análisis de muestras derivadas de la sangre.

65 A pesar de la considerable investigación en la amplificación de la señal en bioensayos, específicamente usando enzimas de auto-replicantes y también en la preparación y en la producción de estas enzimas, todavía se necesitan más estudios. Además, todavía no se ha descubierto una proenzima estable *in vitro* sin trazas de las enzimas

activas correspondientes y también con actividad autocatalítica, en particular no se divulga en la técnica anterior acerca de una pretrombina-2 recombinante, con características autocatalíticas, que muestre estabilidad *in vitro*, sin trazas de  $\alpha$ -trombina.

5 **Descripción de la invención**

**Breve descripción de la invención**

10 La presente invención supera estos problemas de la técnica mediante la divulgación de una nueva metodología para la producción de pretrombina-2 estable recombinante mutante de ratón (SEQ ID NO: 1) y humana (SEQ ID NO: 2) que son capaces de convertirse en  $\alpha$ -trombina activa ellas mismas autocatalíticamente en ausencia de ecarina o factor Xa o cualquier otra sustancia.

15 El método para la obtención de una pretrombina-2 estable recombinante mutante consiste en cambiar el sitio de escisión de una proenzima recombinante mediante mutagénesis dirigida para obtener una proteína estable que pueda ser escindida por la enzima activa correspondiente. Específicamente, los inventores han modificado el sitio de escisión de la pretrombina-2 de ratón (SEQ ID NO: 3) y humana (SEQ ID NO: 4) de tipo nativo o silvestre (TS) a un sitio de escisión de  $\alpha$ -trombina para obtener una enzima autocatalítica artificial estable. La proenzima recombinante mutante es activada por la  $\alpha$ -trombina lo que desencadena la reacción autocatalítica. El concepto de amplificación de la señal usando enzimas autorreplicantes puede aplicarse para la mejora de la sensibilidad de los ensayos de  $\alpha$ -trombina y también para la preparación de diferentes enzimas. Por tanto, la presente invención muestra una enzima recombinante mutante autocatalítica, la pretrombina-2, y su aplicación para la amplificación de la señal en bioensayos para la detección de  $\alpha$ -trombina/protrombina y para la síntesis de  $\alpha$ -trombina recombinante.

25 Sorprendentemente, la pretrombina-2 mutada descrita en la presente invención es completamente estable, sin ninguna traza de trombina, ni de ninguna otra proteasa o de cualquier factor, componente, contaminantes, etc. no deseados, que puedan iniciar una escisión no deseada y/o no controlada de la pretrombina-2 mutante. La invención descrita en el presente documento, permite el control total de la autocatálisis de la pretrombina-2 debido a la estabilidad inesperada mostrada por la pretrombina-2 mutada de la invención. Esta característica de estabilidad de la pretrombina-2 mutada de la presente invención, tiene como ventaja su uso en ensayos *in vitro* para la detección de  $\alpha$ -trombina/protrombina, con más precisión debido a que la pretrombina-2 mutada estable de la invención no tiene actividad basal autocatalítica debido a contaminantes, como los que se han mencionado anteriormente, y su autocatálisis solamente se desencadena por la cantidad de  $\alpha$ -trombina presente en la muestra de ensayo.

35 Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una pretrombina-2 mutante estable y autocatalítica, de origen murino o de origen humano (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, respectivamente) y sus correspondientes secuencias de codificación de ADN (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6, respectivamente).

40 En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de al menos una de las proenzimas de pretrombina-2 mutada o sus secuencias nucleotídicas codificantes, como se ha mencionado anteriormente, para la producción de  $\alpha$ -trombina.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a pretrombina-2 mutante para su uso en la detección *in vitro* de  $\alpha$ -trombina/protrombina. En otro aspecto, la invención se refiere a pretrombina-2 mutante para su uso en el diagnóstico *in vitro* y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con la coagulación. Las enfermedades relacionadas con la coagulación se seleccionan entre el grupo que comprende: hemofilia; trombosis; deficiencia de protrombina heredada, ya sea de tipo I también conocida como hipoprotrombinemia, o de tipo II, también conocida como disprotrombinemia; deficiencia de protrombina adquirida; síndrome de hipoprotrombinemia y enfermedad de von Willebrand.

50 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección de  $\alpha$ -trombina/protrombina en una muestra que comprende la pretrombina-2 mutante como se ha mencionado anteriormente, que comprende al menos una de las proenzimas de pretrombina-2 mutada descritas en la presente invención. El kit descrito en el presente documento también podría incluir otros reactivos, es decir: reactivos de ensayo, tampones y solución salina estéril u otra base farmacéuticamente aceptable de emulsión y de suspensión. Además, los kits pueden incluir materiales instructivos que contienen indicaciones (por ejemplo, protocolos) para la práctica de los métodos de ensayo de la presente invención.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit descrito en el presente documento para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación. La enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia, trombosis, deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II, deficiencia de protrombina adquirida y enfermedad de von Willebrand.

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar  $\alpha$ -trombina activa usando la pretrombina-2 recombinante mutante descrita en la presente invención.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método de diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación que comprende determinar en una muestra de un sujeto, el nivel de expresión o actividad de  $\alpha$ -trombina/protrombina usando el kit descrito en el presente documento y la comparación de dicho nivel de expresión con respecto a los valores de expresión obtenidos de controles sanos. La enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia, trombosis, deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II, deficiencia de protrombina adquirida y enfermedad de von Willebrand. Los niveles de expresión o actividad de  $\alpha$ -trombina/protrombina se analizan en una muestra de sangre. Para este fin es extremadamente importante que la pretrombina-2 que se ha de usar en la reacción de amplificación en la que se basa el ensayo *in vitro* sea estable, porque las trazas de trombina o cualesquiera otras proteasas que contaminan la pretrombina-2 que se ha de usar en la detección de trombina en muestras biológicas, producirían artefactos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Sin embargo, para facilidad de referencia, algunos de estos términos se definirán ahora.

El nivel de expresión o actividad de una  $\alpha$ -trombina/protrombina asociada a una enfermedad es información en un número de formas. Por ejemplo, puede usarse una expresión diferencial de una  $\alpha$ -trombina/protrombina asociada a una enfermedad en comparación con un control, como un diagnóstico de que un paciente padece la enfermedad. También pueden usarse niveles de expresión o actividad de una  $\alpha$ -trombina/protrombina asociada a una enfermedad para controlar el tratamiento y la patología de un paciente. Además, los niveles de expresión o actividad de la  $\alpha$ -trombina/protrombina asociada a una enfermedad pueden permitir la detección de fármacos candidatos para alterar un perfil de expresión particular o suprimir un perfil de expresión asociado a una enfermedad. En la presente invención, los términos "expresión o actividad" en relación con los niveles de  $\alpha$ -trombina/protrombina se usan indistintamente.

El término "muestra" se refiere preferentemente a una muestra de un fluido tal como una solución y más preferentemente se refiere a una muestra de un fluido corporal. Las muestras de fluidos corporales pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas e incluyen, preferentemente, muestras de sangre, plasma, suero, más preferentemente, muestras de plasma.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, incluyendo los seres humanos tanto jóvenes como ancianos de ambos sexos que pueden padecer o estar predispuestos a una patología. El sujeto de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede sufrir de una patología asociada a la expresión o actividad anormal de la vía de coagulación. Los términos "sujeto" y "paciente" se podrían usar indistintamente a lo largo de la presente invención.

La expresión "pretrombina-2 estable" significa, dentro presente invención, una pretrombina-2 en una muestra sin trombina o cualesquiera otras proteasas o cualquier factor, componente, contaminantes, etc. no deseados, que pueden desencadenar la actividad autocatalítica de la pretrombina-2 en sí.

#### Leyendas de las figuras

**Figura 1.** Alineamiento de secuencia del sitio de escisión de la pretrombina-2 de tipo silvestre (TS) y mutante. El sitio de escisión de FXa presente en la pretrombina-2 de TS, correspondiente a los restos IDGRIV, se cambió a IVPRGV que corresponde a un sitio de escisión de  $\alpha$ -trombina (Th). Los aminoácidos modificados están subrayados.

**Figura 2.** Análisis de la pretrombina-2 mutante de ratón purificada. **A)** SDS-PAGE al 12 % teñido con Azul Brillante Coomassie. **B)** Membrana de nitrocelulosa reconocida por anticuerpos monoclonales de ratón anti-marcador His. Calle 1, referencias de masa molecular; carril 2, 0,3  $\mu$ g de pretrombina-2 mutante.

**Figura 3.** Ensayo de estabilidad de la pretrombina-2 mutante humana. Evolución de la intensidad de fluorescencia en muestras que contienen pretrombina-2 recombinante de tipo silvestre humana ( $1,6 \times 10^{-6}$  M) **(a)** o pretrombina-2 recombinante mutante humana ( $1,6 \times 10^{-6}$  M) **(b)**, con el sustrato fluorógeno rodamina 110, bis-(amida de p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-arginina) ( $4 \times 10^{-6}$  M) (Invitrogen) en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, NaCl 150 mM.

**Figura 4.** Evolución de la intensidad de fluorescencia en muestras que contienen **a)**  $\alpha$ -trombina de tipo silvestre humana  $2,2 \times 10^{-12}$  M y pretrombina-2 mutante humana  $2,1 \times 10^{-7}$  M; **b)**  $\alpha$ -trombina de tipo silvestre humana  $2,2 \times 10^{-12}$  M y pretrombina-2 mutante de ratón  $2,1 \times 10^{-7}$  M; **c)**  $\alpha$ -trombina de tipo silvestre humana  $2,2 \times 10^{-12}$  M; **d)** pretrombina-2 mutante humana  $2,1 \times 10^{-7}$  M; **e)** pretrombina-2 mutante de ratón  $2,1 \times 10^{-7}$  M.

**Figura 5.** Cursos temporales de activación y autorreplicación de pretrombina-2 mutante, **a)** pretrombina-2 mutante escindida  $5,38 \times 10^{-9}$  M y pretrombina-2 mutante sin tratar  $2,3 \times 10^{-7}$  M; **b)** pretrombina-2 mutante escindida  $5,38 \times 10^{-9}$  M; **c)** pretrombina-2 mutante sin tratar  $2,3 \times 10^{-7}$  M.

**Figura 6.** **A)** Evolución de la intensidad de fluorescencia en presencia de pretrombina-2 mutante  $5,3 \times 10^{-7}$  M (curvas **a-h**) o en su ausencia (curvas **i-p**). Las muestras contenían diferentes concentraciones de  $\alpha$ -trombina humana: a) e i)  $5 \times 10^{-12}$  M; b) y j)  $3,75 \times 10^{-12}$  M; c) y k)  $2,5 \times 10^{-12}$  M; d) y l) de  $1,5 \times 10^{-12}$  M; e) y m)  $7,5 \times 10^{-13}$  M; f) y n)  $5 \times 10^{-13}$  M; g) y o)  $2,5 \times 10^{-13}$  M; h) y p) 0 M. **B)** Curva de calibración de  $\alpha$ -trombina en presencia (curva a) y en ausencia (curva b) de pretrombina-2 mutante.

**Figura 7. A)** Evolución de la intensidad de fluorescencia en muestras de plasma humano en presencia de pretrombina-2 mutante  $1,5 \times 10^{-6}$  M (curvas **a-f**) o en su ausencia (curvas de **g-1**). Las muestras contenían ecarina  $6 \times 10^{-8}$  M y diferentes volúmenes de plasma humano: a) y g) 2,6 nl; b) y h) 2 nl; c) y i) 1,3 nl; d) y j) 0,67 nl; e) y k) 0,33 nl; f) y l) 0 nl. **B)** Curva de calibración de plasma humano en presencia (curva **a**) o en ausencia (curva **b**) de pretrombina-2 mutante.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una pretrombina-2 mutante que se caracteriza por que tiene la SEQ ID NO: 1, o la SEQ ID NO: 2, o sus secuencias nucleotídicas que las codifican caracterizadas por la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, respectivamente.

En una realización particular de la invención, la pretrombina-2 mutante es la SEQ ID NO: 2 o su secuencia nucleotídica codificante caracterizada por la SEQ ID NO: 6.

En otra realización particular de la invención, la pretrombina-2 mutante que se caracteriza por tener la SEQ ID NO: 2 o por su secuencia nucleotídica codificante: SEQ ID NO: 6, que es de origen humano.

En otra realización particular de la invención, la pretrombina-2 mutante descrita en la presente invención se caracteriza por tener actividad autocatalítica y por ser estable *in vitro*.

La presente invención también se refiere al uso de la pretrombina-2 mutada mencionada anteriormente para la producción de  $\alpha$ -trombina. Además, la presente invención se refiere también a la protrombina-2 mutada para su uso en la detección *in vitro* de  $\alpha$ -trombina/protrombina en muestras biológicas.

La presente invención también describe el uso de la pretrombina-2 mutada mencionada anteriormente para la fabricación de un kit para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación.

En una realización particular del kit de la presente invención, la enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia, trombosis, deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II, deficiencia de protrombina adquirida y enfermedad de von Willebrand.

La presente invención también describe una pretrombina-2 mutante mencionada anteriormente para su uso en el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación. En una realización particular, la enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia, trombosis, deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II, deficiencia de protrombina adquirida y enfermedad de von Willebrand.

La presente invención también se refiere a un método para la preparación de  $\alpha$ -trombina que comprende las siguientes etapas:

1. Modificar, preferentemente por mutagénesis dirigida, la secuencia de ADN que codifica el sitio de escisión del factor Xa en el gen de la pretrombina-2 de tipo silvestre a una secuencia de ADN que codifica el sitio de escisión de  $\alpha$ -trombina.
2. Insertar el ADN mutado de la pretrombina-2 en un vector de expresión.
3. Transformar una célula hospedadora con el vector descrito en la etapa anterior.
4. Cultivar la célula huésped transformada de la etapa anterior en un medio de cultivo apropiado.
5. Recoger las células transformadas y solubilizar las proteínas en cuerpos de inclusión.
6. Aislar el sobrenadante para obtener pretrombina-2 mutante purificada.
7. Poner en contacto la pretrombina-2 mutante purificada obtenida en la etapa anterior con  $\alpha$ -trombina.
8. Separar la  $\alpha$ -trombina obtenida en la etapa anterior 7.

En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del factor Xa en la pretrombina-2 de tipo silvestre es la SEQ ID NO: 17.

En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la trombina en la pretrombina-2 mutante es la SEQ ID NO: 18.

En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque la secuencia de ADN de la pretrombina-2 de tipo silvestre se selecciona entre el grupo que comprende la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8.

En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque el vector es preferentemente un plásmido. Se podría usar cualquier vector o plásmido conocido en la técnica anterior para el mismo fin. En este sentido, puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en bacterias que

contenga el promotor T7 y que codifique un marcador de His en N-terminal. Por otro lado, también puede usarse en la presente invención cualquier vector adecuado para expresión en levadura, que contenga promotores inducibles por galactosa o por metanol y que codifique un marcador de His. Más en particular el plásmido es el plásmido pET-TEV-prethr-2 o el plásmido pQE9-hprethr-2.

5 En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que comprende: células bacterianas, células de animales y/o levadura.

10 En una realización más preferida de la invención la célula hospedadora bacteriana es *E. coli*, preferentemente, *E. coli* XL1-blue o *E. coli* BL21 o cualquier cepa derivada de las mismas.

En una realización más preferida de la invención la célula hospedadora es una levadura seleccionada entre el grupo que comprende: *Saccharomyces sp.* o *Pichia pastoris* o cualquier cepa derivada de las mismas.

15 En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque la relación pretrombina-2: $\alpha$ -trombina de la etapa 7 osciló en  $1:10^{-6}$ .

20 En una realización preferida de la invención, el método descrito en el presente documento se caracteriza porque la purificación de la  $\alpha$ -trombina comprende al menos una etapa de técnicas de cromatografía de afinidad.

La presente invención también describe un kit para la detección de  $\alpha$ -trombina/protrombina en una muestra que comprende la pretrombina-2 mutante, murina o humana, como se desvela en el presente documento.

25 La presente invención también describe el uso del kit mencionado anteriormente para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación.

30 En una realización preferida, la enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia, trombosis, deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II, deficiencia de protrombina adquirida y enfermedad de von Willebrand.

35 La presente invención también describe un método de diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación que comprende la determinación en una muestra de un sujeto del nivel de expresión o actividad de  $\alpha$ -trombina/protrombina usando el kit mencionado anteriormente y la comparación de dicho nivel de expresión o actividad con respecto a los valores para la misma expresión o actividad obtenidos de controles sanos.

40 En una realización preferida del método *in vitro*, la enfermedad relacionada con la coagulación-se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia, trombosis, deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II, deficiencia de protrombina adquirida y enfermedad de von Willebrand.

En una realización preferida del método *in vitro*, la muestra del sujeto se selecciona entre sangre, plasma y/o suero, más preferentemente, muestras de plasma.

45 Aunque también pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales preferidos.

50 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben considerarse en un sentido limitante, sino más bien en un sentido ilustrativo de la invención.

### **Ejemplo 1. Clonación y mutaciones dirigidas específicas del gen de la pretrombina-2**

55 La presente invención describe el cambio del sitio de escisión de una proenzima recombinante, la pretrombina-2, por mutagénesis dirigida, para obtener una enzima autocatalítica artificial estable. Para conseguir este fin, los inventores han clonado el gen de TS de la pretrombina-2 y han modificado el sitio de escisión del factor Xa en la misma, a un sitio de escisión de la trombina para obtener una enzima autocatalítica artificial estable. La estrategia de mutación se basa en la conversión del sitio de escisión del factor Xa (enlace Arg-Ile) en el sitio de escisión de la  $\alpha$ -trombina por mutagénesis dirigida para crear una proteasa autorreplicativa.

60 En resumen, para este enfoque, las secuencias correspondientes a los genes de la pretrombina-2 humana y de ratón se clonaron y se introdujeron cinco mutaciones individuales por mutagénesis dirigida, como se ha mencionado anteriormente, con el fin de crear una pretrombina-2 mutante.

65 En primer lugar, el vector pCMV-SPORT6 que contiene el ADNc de protrombina de ratón de longitud completa se obtuvo de Geneservice (RU). El fragmento de pretrombina-2 se amplificó a partir del mismo vector mediante PCR

utilizando PfuTurbo (Stratagene) y una mezcla de nucleótidos de PCR (Promega). Los cebadores de amplificación fueron la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, que contienen los sitios de restricción BamHI y XhoI respectivamente. El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa, se purificó con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se digirió con BamHI y XhoI (Takara). Posteriormente, el fragmento se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se ligó en el vector de expresión pET-TEV, un vector pET-19b modificado mediante la introducción de un sitio de escisión de la proteasa TEV (proporcionado generosamente por el Dr. Lars Backman) dando lugar al plásmido pET TEV-prethr-2. Se verificó la exactitud de la secuencia insertada (MWG Alemania). El plásmido pET-TEV-prethr-2 se usó como molde para mutar el gen de la pretrombina-2. Se introdujeron las mutaciones específicas dirigidas usando los siguientes cebadores: SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12 con el kit de mutagénesis dirigida QuikChange II (Stratagene). Se verificó la exactitud de la secuencia mutante (MWG Alemania).

El vector pOTB7 que contiene el ADNc de longitud completa de la protrombina humana se obtuvo de Geneservice (RU). El fragmento de pretrombina-2 se amplificó a partir del mismo vector mediante PCR usando PfuTurbo (Stratagene) y una mezcla de nucleótidos de PCR (Promega). Los cebadores de amplificación fueron la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 que contienen los sitios de restricción Sall y HindIII, respectivamente. El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa, se purificó con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se digirió con Sall y HindIII (Takara). Posteriormente, el fragmento se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se ligó en el vector de expresión pQE9 (Qiagen), dando lugar al plásmido pQE9-hprethr-2. Se verificó la exactitud de la secuencia insertada (MWG Alemania). El plásmido pQE9-hprethr-2 se usó como molde para mutar el gen de la pretrombina-2 humana. Se introdujeron mutaciones específicas dirigidas usando los siguientes cebadores SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 con el kit de mutagénesis dirigida QuikChange II (Stratagene). Se verificó la exactitud de la secuencia mutante (MWG Alemania).

Como resultado, el sitio de escisión de FXa presente en la pretrombina-2 de tipo silvestre (TS), correspondiente a los restos de la SEQ ID NO: 17, se cambió por los restos de la SEQ ID NO: 18, que corresponden al sitio de escisión de trombina. La Figura 1 muestra la alineación de los sitios de escisión de FXa y de la trombina de la pretrombina-2 mutante y del TS, respectivamente. Los aminoácidos modificados están subrayados. La trombina escinde selectivamente los enlaces Arg-Gly en el fibrinógeno y otros polipéptidos. Los estudios sobre el sitio de escisión de la trombina a partir de 30 polipéptidos diferentes, reveló que el sitio de escisión óptimo tiene la estructura de P4-P3-Pro-Arg-P1'-P2', donde P4 y P3 son aminoácidos hidrófobos y P1' y P2' son aminoácidos no ácidos. Se observó también que los polipéptidos que contenían Gly en P1' eran especialmente susceptibles a la escisión por trombina [24].

### **Ejemplo 2. Expresión y purificación de la pretrombina-2 mutante**

El plásmido que contenía las secuencias mutadas de la pretrombina-2 humana y de ratón se usó para transformar células de *Escherichia coli* y las proteínas protrombina-2 mutante humana y de ratón, se expresaron y se purificaron.

En particular, se transformaron células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) por choque térmico con el plásmido que contenía el gen de la pretrombina-2 mutante de ratón. Las células se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani suplementado con 100 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una DO600 de ≈0,7. La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de tio-β-D-galactósido de isopropilo 0,1 mM. Las células se cultivaron durante 4 horas a 37°C y se recogieron por centrifugación. Se realizó una purificación de cuerpos de inclusión como se describe en Soejima et al. [25] con algunas modificaciones. Después del replegamiento de las proteínas, la muestra se dializó frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, durante dos días a 4°C sin agitación. La muestra dializada se centrifugó y el sobrenadante resultante se filtró. La fracción de transferencia se cargó en una columna de afinidad HisTrap™ HP de níquel (GE Healthcare) controlada por un equipo purificador ÄKTA (GE Healthcare). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de imidazol en Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM. La pureza de la proteína se investigó por SDS-PAGE al 12%.

El análisis electroforético de la proteína purificada mostró una única banda correspondiente al tamaño esperado (Figura 2A). La identidad de la proteína se confirmó por transferencia Western usando anticuerpos contra polipéptidos marcada con His (Figura 2B).

Para la purificación de la pretrombina-2 humana mutada, se transformaron células de *Escherichia coli* XL1-blue (DE3) por choque térmico con el plásmido que contenía el gen de pretrombina-2 humana mutante. Las células se cultivaron a 37 °C en medio Luria-Bertani suplementado con 100 µg/ml de ampicilina para alcanzar una DO600 de ≈0,6. La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de tio-β-D-galactósido de isopropilo 0,1 mM. Las células se cultivaron durante 4 horas a 37 °C y se recogieron por centrifugación. Se realizó una purificación de proteínas de cuerpos de inclusión como se ha descrito anteriormente para la pretrombina-2 mutante de ratón. Después del replegamiento de las proteínas, la muestra se dializó frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, durante dos días a 4 °C sin agitación. La muestra dializada se centrifugó y el sobrenadante resultante se filtró. La fracción de transferencia se cargó en una columna de afinidad HiTrap™ HeparinHP de níquel (GE Healthcare) controlada por un equipo purificador ÄKTA (GE Healthcare). La proteína se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 2 M en Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. La pureza de la proteína se investigó por SDS-PAGE al 12 % (Figura 2A).

Transferencia Western

Las proteínas, la pretrombina-2 mutante de ratón y la pretrombina-2 mutante humana, se separaron por SDS-PAGE al 12% y se electrotransfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. Después, la membrana se incubó durante 1 h en solución salina tamponada con fosfato (PBS), que contenía Tween 20 al 0,05% y leche desnatada al 10%. Después, la membrana se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y se incubó con anticuerpos anti-His monoclonales de ratón (GE Healthcare) durante 1 h. Después, la membrana se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y se incubaron adicionalmente con anticuerpos IgG anti-ratón secundarios de conejo conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) durante 1 h. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, las bandas de proteína se desarrollaron con una solución de fosfato/nitro de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo azul de tetrazolio (Fluka) (Figura 2B).

**Ejemplo 3. Ensayo de Estabilidad de la pretrombina-2 mutante**

Se realizaron ensayos de estabilidad mezclando pretrombina-2 de TS humana o mutante humana ( $1,6 \times 10^{-6}$  M) ambas producidas por recombinación en *E. coli*, con el sustrato fluorógeno rodamina 110, bis-(amida de p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-arginina) ( $4 \times 10^{-6}$  M) (Invitrogen) en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, NaCl 150 mM. La fluorescencia de las soluciones resultantes se controló usando  $\lambda$  de excitación = 498 nm y  $\lambda$  de emisión = 521 nm.

El ensayo de estabilidad mide en tiempo real la actividad enzimática de la  $\alpha$ -trombina activa en presencia del sustrato fluorógeno (p-tosil-Gly-Pro-Arg)<sub>2</sub>- rodamina 110 (Invitrogen). Este sustrato contiene la secuencia de aminoácidos reconocida por la  $\alpha$ -trombina, que es una peptidasa. La trombina escinde el aminoácido liberando la rodamina fluorescente. Durante el ensayo, se midió el aumento de fluorescencia con el tiempo. A mayor actividad enzimática de la  $\alpha$ -trombina mayor es la velocidad de escisión, y por tanto la liberación de rodamina, lo que provoca el aumento de la fluorescencia. La Figura 3 muestra que la pretrombina-2 recombinante humana de TS (a) es menos estable que la pretrombina-2 recombinante humana mutante desvelada en la presente invención (b). El ensayo con pretrombina-2 recombinante mutada de la invención no muestra ningún aumento en la fluorescencia durante 15 h (55 000 s). Esto implica que en la preparación de la pretrombina-2 recombinante mutada de la invención no hay restos de  $\alpha$ -trombina activa, ni se producen durante el tiempo que se realiza el ensayo. Por otro lado, el ensayo con pretrombina-2 recombinante humana de TS muestra un aumento en la fluorescencia desde el comienzo del ensayo. Este aumento de la fluorescencia indica la presencia de  $\alpha$ -trombina activa en la preparación; aunque también se obtuvo pretrombina-2 recombinante humana de TS por ingeniería genética en *E. coli*. Por tanto, la estabilidad *in vitro* mostrada por la pretrombina humana mutante de la presente invención se debió a la mutagénesis operada en el presente documento.

**Ejemplo 4. Ensayos de actividad de  $\alpha$ -trombina**

Con el fin de verificar si la  $\alpha$ -trombina humana podía escindir la pretrombina-2 mutada recombinante humana y de ratón, se incubaron ambas proteínas recombinantes mutadas con  $\alpha$ -trombina humana de TS (Sigma Aldrich) en presencia del sustrato fluorógeno (p-tosil-Gly-Pro-Arg)<sub>2</sub>-rodamina 110 (Invitrogen). Los ensayos de actividad de la trombina se realizaron en un lector de microplacas Varioskan Flash (Thermo Scientific) usando placas de micropocillos negros a temperatura ambiente. Se incubaron las muestras (100  $\mu$ l de volumen final) en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, NaCl 150 mM con rodamina 110  $4 \times 10^{-6}$  M, bis-(amida de p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-arginina) (Invitrogen) y la fluorescencia de la solución resultante se controló usando  $\lambda$  de excitación = 498 nm y  $\lambda$  de emisión = 521 nm.

Los resultados obtenidos del experimento demostraron que en presencia de  $\alpha$ -trombina humana de TS, la actividad de la proteasa aumenta considerablemente con el tiempo (Figura 4, curvas a, b), en comparación con las muestras en las que sólo se añadió  $\alpha$ -trombina de TS (Figura 4, curva c). Por otra parte, en ausencia de  $\alpha$ -trombina de TS, ninguno de los dos mutantes presentó actividad enzimática (Figura 4, curvas d, e), lo que demuestra su estabilidad en las condiciones experimentales. Estos resultados indican claramente que la  $\alpha$ -trombina de TS es capaz de escindir ambas pretrombinas-2 mutantes recombinantes para generar enzimas activas con actividad  $\alpha$ -trombina. La  $\alpha$ -trombina exógena activa la pretrombina-2 mutante recombinante convirtiéndola en  $\alpha$ -trombina endógena que a su vez escinde otras macromoléculas de pretrombina-2 y el sustrato fluorógeno en el curso de esta reacción autocatalítica.

**Ejemplo 5. Ensayos de autorreplicación de pretrombina-2 mutante**

Otro experimento demostró que la  $\alpha$ -trombina endógena generada es capaz de escindir la pretrombina-2 mutada recombinante para mantener el proceso autocatalítico. Una solución de pretrombina-2 mutada se trató con  $\alpha$ -trombina inmovilizada sobre agarosa. Se escindió pretrombina-2 mutante de ratón usando el kit Thrombin CleanCleave™ (Sigma-Aldrich) como se describe en las instrucciones del fabricante. Después, la solución de proteína se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m para eliminar cualquier resto. Para investigar la reacción autocatalítica, se mezcló pretrombina-2 mutante de ratón escindida  $5,38 \times 10^{-9}$  M con y sin pretrombina-2 mutante de ratón sin tratar  $2,3 \times 10^{-7}$  M y con el sustrato fluorógeno (p-tosil-Gly-Pro-Arg)<sub>2</sub>-rodamina 110 (Invitrogen). Después, la evolución de la intensidad de fluorescencia se controló usando  $\lambda$  de excitación = 498 nm y  $\lambda$  de emisión = 521 nm.

La Figura 5 muestra que en presencia de la pretrombina-2 mutante escindido y exceso de la pretrombina-2 mutante no tratada (Figura 5 curva a), la señal de fluorescencia aumentó considerablemente en comparación con la muestra en la que solo se incluyó la pretrombina-2 mutante escindida (Figura 5 curva b). La pretrombina-2 mutante no tratada se trató con la solución tampón utilizada para lavar la  $\alpha$ -trombina sobre agarosa no mostró ninguna actividad (Figura 5 curva c). En consecuencia, el crecimiento de la actividad de la proteasa no fue provocado por la  $\alpha$ -trombina exógena que podría haberse desprendido de la agarosa. Este experimento confirma la capacidad de la  $\alpha$ -trombina endógena derivada de pretrombina-2 mutada para participar en la reacción autocatalítica.

#### 10 **Ejemplo 6. Detección de $\alpha$ -trombina**

Se mezclaron diferentes concentraciones de  $\alpha$ -trombina humana (Sigma-Aldrich) con y sin pretrombina-2 mutante de ratón no tratada  $5,3 \times 10^{-7}$  M descrita en el presente documento. Las reacciones se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, NaCl 150 mM con rodamina 110  $4 \times 10^{-6}$  M, bis-(amida de p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-arginina) (Invitrogen) y la fluorescencia de la solución resultante se controló usando  $\lambda$  de excitación = 498 nm y  $\lambda$  de emisión = 521 nm.

La Figura 6A muestra la evolución de las intensidades de fluorescencia para cantidades variables de  $\alpha$ -trombina humana mezclada con el sustrato fluorógeno en presencia (Figura 6 curvas a-h) o ausencia (Figura 6 curvas i-p) de pretrombina-2 mutada. Las intensidades de fluorescencia mostraron un crecimiento exponencial en presencia del mutante, lo que apunta al carácter autocatalítico de la reacción. En dicho caso, las curvas de calibración de la primera derivada de la intensidad de la fluorescencia con respecto al tiempo  $dF/dt$ , que representa la velocidad de reacción después de 2 horas, frente al análisis de la concentración (Figura 6B) son más informativas que las curvas convencionales [26]. Sobre la base de las curvas de calibración obtenidas se calculó el límite de detección de los sistemas operando sin pretrombina-2 mutada (0,488 pM, S/N = 3, n = 3) y con el mutante (10 fM, S/N = 3, n = 3).

#### 25 **Ejemplo 7. Detección de protrombina en plasma humano**

La presente invención muestra la ventaja del ensayo amplificado para determinar la protrombina sobre un método de cuantificación no amplificado convencional (Figura 7). Se mezclaron concentraciones variables de plasma humano combinado (Sigma-Aldrich) con ecarina  $6 \times 10^{-8}$  M (Sigma-Aldrich) con o sin pretrombina-2 mutante de ratón  $1,5 \times 10^{-6}$  M. Las reacciones se realizaron en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0, NaCl 150 mM con rodamina  $4 \times 10^{-6}$  M 110, bis-(amida de p-tosil-L-glicil-L-prolil-L-arginina) (Invitrogen) y la fluorescencia de la solución resultante se controló usando  $\lambda$  de excitación = 498 nm y  $\lambda$  de emisión = 521 nm.

Los límites de detección de los ensayos amplificado (7,7 pl, S/N = 3, DTR = 12 %, n = 3) y no amplificado (710 pl, S/N = 3, DTR = 6 %, n = 3) se calcularon de acuerdo con las curvas de calibración (Figura 7B) que representan  $dF/dt$  en el tiempo fijo de 60 min frente al volumen de plasma humano por pocillo de la microplaca. Teniendo en cuenta que el plasma humano por lo general contiene 90  $\mu\text{g/ml}$  de protrombina [27] el ensayo con la amplificación autocatalítica permitió detectar tan poco como 0,693 pg de protrombina por pocillo de la microplaca. El ensayo no amplificado convencional permitió cuantificar tan poco como 63,9 pg del analito por pocillo. Por tanto, el empleo de cascada de amplificación autocatalítica permite disminuir el volumen de plasma humano necesario para el ensayo de protrombina en dos órdenes de magnitud.

#### 45 **Bibliografía**

- [1] J. H. Lawson, *Semin. Thromb. Hemost.* 2006, 32 Supl. 1, 98-110.
- [2] J. K. Heffernan, R. A. Ponce, L. A. Zuckerman, J. P. Volpone, J. Visich, E. E. Giste, N. Jenkins, D. Boster, S. Pederson, G. Knitter, T. Palmer, M. Wills, R. J. Early, M. C. Rogge, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007, 47, 48-58.
- [3] M. F. Doyle, K. G. Mann, *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 10693-10701.
- [4] E. E. DiBella, M. C. Maurer, H. A. Scheraga, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 163-169.
- [5] H. Yonemura, T. Imamura, K. Soejima, Y. Nakahara, W. Morikawa, Y. Ushio, Y. Kamachi, H. Nakatake, K. Sugawara, T. Nakagaki, C. Nozaki, *J. Biochem.* 2004, 135, 577-582.
- [6] B. Potzsch, S. Hund, K. Madlener, C. Unkrig, G. Muller-Berghaus, *Thromb. Res.* 1997, 86, 373-383.
- [7] K. Fujikawa, E. W. Davie, en *Methods in Enzymology*, Vol. 45, 1976, págs. 89-95.
- [8] L. Zhu, R. Yang, J. Zhai, C. Tian, *Biosens. Bioelectron.* 2007, 23, 528-535.
- [9] H. Nakamura, Y. Mogi, T. Akimoto, K. Naemura, T. Kato, K. Yano, I. Karube, *Biosens. Bioelectron.* 2008, 24, 455-460.
- [10] A. Virel, L. Saa, V. Pavlov, *Anal. Chem.* 2009, 81, 268-272.
- [11] L. Pollegioni, L. Piubelli, G. Molla, *Febs J.* 2009, 276, 6857-6870.
- [12] L. Caseli, A. C. Perinotto, T. Viitala, V. Zucolotto, O. N. Oliveira, *Langmuir* 2009, 25, 3057-3061.
- [13] R. M. Lequin, *Clin. Chem.* 2005, 51, 2415-2418.
- [14] D. L. Bates, *Trends Biotechnol.* 1987, 5, 204-209.
- [15] B. Shlyahovsky, V. Pavlov, L. Kaganovsky, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006, 45, 4815-4819.
- [16] A. R. Khan, M. N. James, *Protein Sci.* 1998, 7, 815-836.
- [17] C. J. Gadgil, B. D. Kulkarni, *AIChE J.* 2009, 55, 556-562.
- [18] J.-W. Wu, Y. Wu, Z.-X. Wang, *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 1547-1553.

[19] D. Barrett, *Biochem. J.* 1970, 117, 57-59.

[20] Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006, 45, 2238-2242.

[21] Y. Weizmann, Z. Cheglakov, V. Pavlov, I. Willner, *Nat. Protoc.* 2006, 1, 554-558.

[22] S. P. Leytus, W. L. Patterson, W. F. Mangel, *Biochem. J.* 1983, 215, 253-260.

5 [23] M. K. Ramjee, *Anal. Biochem.* 2000, 277, 11-18.

[24] J. Y. Chang, *Eur. J. Biochem.* 1985, 151, 217-224.

[25] K. Soejima, N. Mimura, H. Yonemura, H. Nakatake, T. Imamura, C. Nozaki, *J. Biochem.* 2001, 130, 269-277.

[26] L. Saa, A. Virel, J. Sanchez-Lopez, V. Pavlov, *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 6187-6192.

[27] J. A. Rob, S. Tollefsen, L. Helgeland, *Anal. Biochem.* 1997, 245, 222-225.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Asociación Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales-CIC biomaGUNE

15

<120> MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE TROMBINA HUMANA Y USOS DEL MISMO

<130> PCT-05774

20

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

25

<210> 1

<211> 339

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(12)

<223> Cola de histidina

35

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (79)..(80)

<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida

40

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (82)..(82)

<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida

<400> 1

ES 2 633 172 T3

Met Gly His Ser Ser Gly His  
 1 5 10 15

Ile Asp Ser Asp Ile Lys Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser  
 20 25 30

Thr Thr Asp Ala Glu Phe His Thr Phe Phe Asn Glu Lys Thr Phe Gly  
 35 40 45

Leu Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser  
 50 55 60

Leu Lys Asp Thr Thr Glu Lys Glu Leu Leu Asp Ser Tyr Ile Val Pro  
 65 70 75 80

Arg Gly Val Glu Gly Trp Asp Ala Glu Lys Gly Ile Ala Pro Trp Gln  
 85 90 95

Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser  
 100 105 110

ES 2 633 172 T3

Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Leu Tyr  
 115 120 125

Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile  
 130 135 140

Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Val Glu Lys Ile Ser  
 145 150 155 160

Met Leu Glu Lys Ile Tyr Val His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn  
 165 170 175

Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Lys Lys Pro Val Pro Phe  
 180 185 190

Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Lys Gln Thr Val Thr  
 195 200 205

Ser Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn  
 210 215 220

Leu Arg Glu Thr Trp Thr Thr Asn Ile Asn Glu Ile Gln Pro Ser Val  
 225 230 235 240

Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Ala  
 245 250 255

Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe Lys  
 260 265 270

Val Asn Asp Thr Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly  
 275 280 285

Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly  
 290 295 300

Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Phe  
 305 310 315 320

Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Arg Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp  
 325 330 335

Gln Phe Gly

<210> 2  
 <211> 322  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 633 172 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(10)  
 <223> Cola de histidina

5

<220>  
 <221> MUTAGEN  
 <222> (61)..(62)  
 <223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida

10

<220>  
 <221> MUTAGEN  
 <222> (64)..(64)  
 <223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida

15

<400> 2

```

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Asp Thr Ala
1          5          10

Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly
          20          25          30

Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu
          35          40          45

Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Val Pro Arg Gly
          50          55          60

Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met
65          70          75          80

Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile
          85          90          95

Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro
          100          105          110

Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys
          115          120          125

His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu
          130          135          140

Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp
145          150          155          160

Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp
          165          170          175
  
```

ES 2 633 172 T3

Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu  
 180 185 190

Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys  
 195 200 205

Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln  
 210 215 220

Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr  
 225 230 235 240

Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp  
 245 250 255

Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe  
 260 265 270

Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val  
 275 280 285

Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr  
 290 295 300

His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe  
 305 310 315 320

Gly Glu

<210> 3  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(10)  
 <223> Cola de histidina

<400> 3

Met Gly His Ser Ser Gly His  
 1 5 10 15

Ile Asp Ser Asp Ile Lys Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser  
 20 25 30

5

10

15

ES 2 633 172 T3

Thr Thr Asp Ala Glu Phe His Thr Phe Phe Asn Glu Lys Thr Phe Gly  
 35 40 45  
 Leu Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Asp Thr Thr Glu Lys Glu Leu Leu Asp Ser Tyr Ile Asp Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Ile Val Glu Gly Trp Asp Ala Glu Lys Gly Ile Ala Pro Trp Gln  
 85 90 95  
 Val Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser  
 100 105 110  
 Leu Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Leu Tyr  
 115 120 125  
 Pro Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile  
 130 135 140  
 Gly Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Val Glu Lys Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Met Leu Glu Lys Ile Tyr Val His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn  
 165 170 175  
 Leu Asp Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Lys Lys Pro Val Pro Phe  
 180 185 190  
 Ser Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Lys Gln Thr Val Thr  
 195 200 205  
 Ser Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn  
 210 215 220  
 Leu Arg Glu Thr Trp Thr Thr Asn Ile Asn Glu Ile Gln Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Leu Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Ala  
 245 250 255  
 Ser Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe Lys  
 260 265 270  
 Val Asn Asp Thr Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly  
 275 280 285

ES 2 633 172 T3

Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly  
 290 295 300

Ile Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Phe  
 305 310 315 320

Tyr Thr His Val Phe Arg Leu Lys Arg Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp  
 325 330 335

Gln Phe Gly

<210> 4  
 <211> 322  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(10)  
 <223> Cola de histidina

<400> 4

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Asp Thr Ala  
 1 5 10 15

Thr Ser Glu Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly  
 20 25 30

Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu  
 35 40 45

Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile  
 50 55 60

Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met  
 65 70 75 80

Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile  
 85 90 95

Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro  
 100 105 110

Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys  
 115 120 125

His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu

5

10

15



ES 2 633 172 T3

	<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida	
	<220>	
	<221> mutación	
5	<222> (148)..(149)	
	<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida	
	<400> 5	
	accaccgatg cggagttcca caccttcttc aatgagaaga ccttcggcct tggggaggca	60
	gactgtggcc tgcggccttt gttcgagaag aagtcgttga aagacacaac cgaaaaggag	120
	cttcttgact cttacatagt cccgcgcggc gtggagggct gggacgctga gaagggtatc	180
	gccccctggc aggtgatgct ttttcggaag agtccccaaag agctgctgtg tggggccagc	240
	cttatcagtg accgatgggt cctcactgct gccactgca ttctgtacce accctgggac	300
	aagaacttca ctgagaatga cctcctggtg cgcattggca agcattcccg aaccagatat	360
	gagcggaatg ttgaaaagat ctccatgctg gaaaagatct acgtccaccc cagatataac	420
	tggcgggaga acctagaccg cgatatcgct ctgctcaagc taaagaaacc tgtacccttc	480
	agtgactata ttcaccccgt gtgtttgcca gacaagcaga cagtaaccag cttgctccgg	540
	gctggttata aagggcgggt gacaggctgg ggcaaccttc gggagacatg gacaaccaac	600
	atcaatgaga tacagcccag cgtcctgcag gtggtgaacc tgcccattgt agagcggcca	660
	gtgtgcaagg cctccacccg gattcgaatt actgacaaca tgttctgtgc tggcttcaag	720
	gtgaatgaca ccaagcgagg agatgcttgt gaaggtgaca gtggaggacc ttttgtcatg	780
	aagagcccct ttaacaaccg ctggtatcaa atgggtattg tctcatgggg tgaaggatgt	840
	gaccggaagg ggaaatacgg cttctacacg catgtgttcc gtctgaaaag gtggatacag	900
10	aaagtcattg atcaatttgg atag	924
	<210> 6	
	<211> 969	
	<212> ADN	
15	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (182)..(182)	
20	<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida	
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (184)..(185)	
25	<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida	
	<220>	
	<221> mutación	
	<222> (190)..(191)	
30	<223> Restos mutados obtenidos por mutagénesis dirigida	
	<400> 6	

ES 2 633 172 T3

atgagaggat	cgcatcacca	tcacccatcac	ggatccgtcg	acaccgccac	cagtgagtac	60
cagactttct	tcaatccgag	gacctttggc	tcgggagagg	cagactgtgg	gctgogacct	120
ctgttcgaga	agaagtcgct	ggaggacaaa	accgaaagag	agctcctgga	atcctacatc	180
gtcccgcgcg	gtgtggaggg	ctcggatgca	gagatcggca	tgtcaccttg	gcaggtgatg	240
cttttccgga	agagtcccca	ggagctgctg	tgtggggcca	gcctcatcag	tgaccgctgg	300
gtcctcaccg	ccgcccactg	cctcctgtac	ccgccctggg	acaagaactt	caccgagaat	360
gaccttctgg	tgcgcattgg	caagcactcc	cgcaccaggt	acgagcgaaa	cattgaaaag	420
atatccatgt	tggaaaagat	ctacatccac	cccaggtaca	actggcggga	gaacctggac	480
cgggacattg	ccctgatgaa	gctgaagaag	cctggtgctt	tcagtgacta	cattcacctt	540
gtgtgtctgc	ccgacagggg	gacggcagcc	agcttgctcc	aggctggata	caaggggctg	600
gtgacaggct	ggggcaacct	gaaggagacg	tggacagcca	acgttggtaa	ggggcagccc	660
agtgtcctgc	aggtggtgaa	cctgccatt	gtggagcggc	cggctctgcaa	ggactccacc	720
cggatccgca	tactgacaa	catgttctgt	gctggttaca	agcctgatga	agggaaacga	780
gggatgcct	gtgaaggatg	cagtggggga	ccctttgtca	tgaagagccc	ctttaacaac	840
cgctggtatc	aatgggcat	cgtctcatgg	ggtgaaggct	gtgaccggga	tgggaaatat	900
ggcttctaca	cacatgtgtt	ccgcctgaag	aagtggatac	agaaggtcat	tgatcagttt	960
ggagagtag						969

<210> 7  
 <211> 924  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 7

5

ES 2 633 172 T3

accaccgatg cggagttcca caccttcttc aatgagaaga ccttcggcct tggggaggca	60
gactgtggcc tgcggccttt gttcgagaag aagtcgttga aagacacaac cgaaaaggag	120
cttcttgact cttacataga cgggcgcatac gtggagggct gggacgctga gaagggtatc	180
gccccctggc aggtgatgct ttttcggaag agtccccaag agctgctgtg tggggccagc	240
cttatcagtg accgatgggt cctcactgct gcccaactgca ttctgtaccc accctgggac	300
aagaacttca ctgagaatga cctcctgggt cgcattggca agcattcccg aaccagatat	360
gagcggaatg ttgaaaagat ctccatgctg gaaaagatct acgtccaccc cagatataac	420
tggcggggaga acctagaccg cgatatcgct ctgctcaagc taaagaaacc tgtacccttc	480
agtgactata ttcaccccgt gtgtttgcca gacaagcaga cagtaaccag cttgctccgg	540
gctggttata aagggcgggt gacaggctgg ggcaaccttc gggagacatg gacaaccaac	600
atcaatgaga tacagcccag cgtcctgcag gtggtgaacc tgcccattgt agagcggcca	660
gtgtgcaagc cctccacccg gattcgaatt actgacaaca tgttctgtgc tggcttcaag	720
gtgaatgaca ccaagcgagg agatgcttgt gaaggtgaca gtggaggacc ttttgtcatg	780
aagagcccct ttaacaaccg ctggtatcaa atgggtattg tctcatgggg tgaaggatgt	840
gaccggaagc ggaaatacgg cttctacacg catgtgttcc gtctgaaaag gtggatacag	900
aaagtcattg atcaatttgg atag	924

<210> 8  
 <211> 969  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 8

5

ES 2 633 172 T3

atgagaggat cgcacaccca tcacatcac ggatccgtcg acaccgccac cagtgagtac 60  
cagactttct tcaatccgag gacctttggc tcgggagagg cagactgtgg gctgcgacct 120  
ctgttcgaga agaagtcgct ggaggacaaa accgaaagag agctcctgga atcctacatc 180  
gacgggcgca ttgtggaggg ctcgatgca gagatcggca tgtcaccttg gcaggtgatg 240  
ctttccgga agagtcccca ggagctgctg tgtggggcca gcctcatcag tgaccgctgg 300  
gtcctcaccg ccgccactg cctcctgtac ccgccctggg acaagaactt caccgagaat 360  
gaccttctgg tgcgcattgg caagcactcc cgcaccaggt acgagcgaaa cattgaaaag 420  
atatccatgt tggaaaagat ctacatccac cccaggtaca actggcggga gaacctggac 480  
cgggacattg ccctgatgaa gctgaagaag cctgttgctc tcagtgacta cattcaccct 540  
gtgtgtctgc ccgacagggg gacggcagcc agcttgctcc aggctggata caagggcgcg 600  
gtgacaggct ggggcaacct gaaggagacg tggacagcca acgttggtaa ggggcagccc 660  
agtgtcctgc aggtggtgaa cctgcccatt gtggagcggc cggctctgcaa ggactccacc 720  
cggatccgca tcaactgacaa catgttctgt gctggttaca agcctgatga agggaaacga 780  
gggatgcct gtgaaggatga cagtggggga ccctttgtca tgaagagccc cttaacaac 840  
cgctggtatc aaatgggcat cgtctcatgg ggtgaaggct gtgaccggga tgggaaatat 900  
ggcttctaca cacatgtgtt ccgcctgaag aagtggatac agaaggatcat tgatcagttt 960  
ggagagtag 969

- 5 <210> 9  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
 <223> Cebador directo de pretrombina-2 de ratón
- 15 <400> 9  
 cgcgatcca ccaccgatgc ggagtcc 28
- 20 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> Cebador reverso de pretrombina-2 de ratón
- 30 <400> 10  
 ccgctcgagc tatccaaatt gatcaatgac 30
- <210> 11  
 <211> 45  
 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>

## ES 2 633 172 T3

<223> Cebador directo para mutaciones específicas de sitio del gen de la pretrombina-2 de ratón

<400> 11  
5 cttcttgact cttacatagt cccgcgcggc gtggagggt gggac 45

<210> 12  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador reverso para mutaciones específicas de sitio del gen de la pretrombina-2 de ratón

<400> 12  
15 gtcccagccc tccacgccgc gcgggactat gtaagagtca agaag 45

<210> 13  
<211> 25  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo de pretrombina-2 humana

25 <400> 13  
acgctgcgac accgccacca gtgag 25

<210> 14  
<211> 27  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> Cebador reverso de pretrombina-2 de ratón

<400> 14  
cccaagcttc tactctcaa actgatc 27

<210> 15  
40 <211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> Cebador directo para mutaciones específicas de sitio del gen de la pretrombina-2 humana

<400> 15  
cctggaatcc tacatcgtcc cgcgcgggtg ggagggtcg gatg 44

50 <210> 16  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador reverso para mutaciones específicas de sitio del gen de la pretrombina-2 humana

<400> 16  
60 catccgagcc ctccacaccg cgcgggacga tgtaggattc cagg 44

<210> 17  
<211> 6  
<212> PRT  
65 <213> Homo sapiens

ES 2 633 172 T3

<400> 17

Ile Asp Gly Arg Ile Val  
1 5

5 <210> 18  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

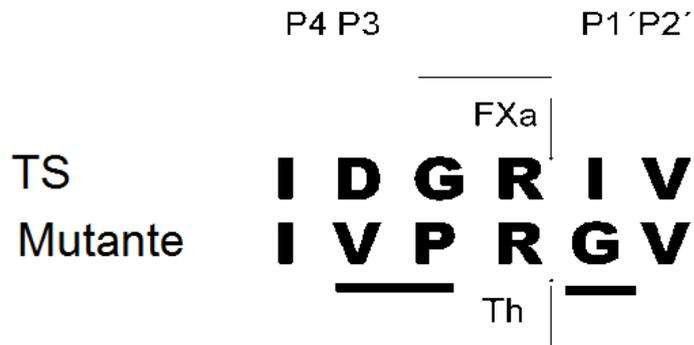
10 <400> 18

Ile Val Pro Arg Gly Val  
1 5

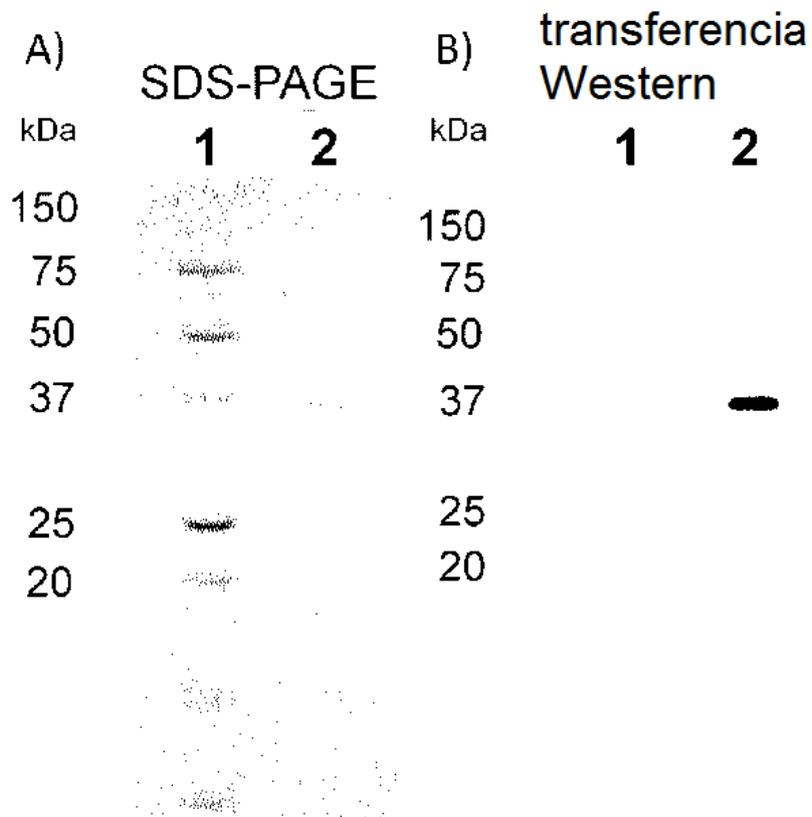
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Pretrombina-2 mutante **caracterizada porque** tiene la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o sus secuencias nucleotídicas codificantes **caracterizadas por** la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, respectivamente.
2. Pretrombina-2 mutante de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** tiene actividad autocatalítica y porque es estable *in vitro*.
- 10 3. Uso de la pretrombina-2 mutante de las reivindicaciones 1 a 2 para la producción de  $\alpha$ -trombina.
4. Pretrombina-2 mutante de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en la detección *in vitro* de  $\alpha$ -trombina/protrombina.
- 15 5. Pretrombina-2 mutante de las reivindicaciones 1 a 2 para su uso en el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación.
6. Pretrombina-2 mutante para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia; trombosis; deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II; deficiencia de protrombina adquirida; síndrome de hipoprotrombinemia y enfermedad de von Willebrand.
- 20 7. Método para la preparación de  $\alpha$ -trombina que comprende las etapas siguientes:
- 25 1. Modificar, preferentemente por mutagénesis dirigida, la secuencia de ADN que codifica el sitio de escisión del factor Xa en el gen de la pretrombina-2 de tipo silvestre a una secuencia de ADN que codifica el sitio de escisión de  $\alpha$ -trombina.
2. Insertar el ADN mutado de pretrombina-2 en un vector de expresión.
3. Transformar una célula hospedadora con el vector descrito en la etapa anterior.
- 30 4. Cultivar la célula huésped transformada de la etapa anterior en un medio de cultivo apropiado.
5. Recoger las células transformadas y solubilizar las proteínas en cuerpos de inclusión.
6. Aislar el sobrenadante para obtener pretrombina-2 mutante purificada.
7. Poner en contacto la pretrombina-2 mutante purificada obtenida en la etapa anterior con  $\alpha$ -trombina.
8. Separar la  $\alpha$ -trombina obtenida en la etapa anterior 7.
- 35 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión del factor Xa en la pretrombina-2 de tipo silvestre es la SEQ ID NO: 17.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión de la trombina en la pretrombina-2 mutante es la SEQ ID NO: 18.
- 40 10. Método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que la secuencia de ADN de la pretrombina-2 de tipo silvestre se selecciona entre el grupo que comprende la SEQ ID NO: 7 o la SEQ ID NO: 8.
- 45 11. Un kit para la detección de  $\alpha$ -trombina/protrombina en una muestra que comprende la pretrombina-2 mutante de las reivindicaciones 1 a 2.
12. Uso del kit de la reivindicación 11 para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de enfermedades relacionadas con la coagulación.
- 50 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que las enfermedades de la coagulación se seleccionan entre el grupo que comprende: hemofilia; trombosis; deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II; deficiencia de protrombina adquirida; síndrome de hipoprotrombinemia y enfermedad de von Willebrand.
- 55 14. Un método *in vitro* de diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con la coagulación que comprende la determinación en una muestra de un sujeto del nivel de actividad de  $\alpha$ -trombina/protrombina usando el kit de la reivindicación 11 y la comparación de dicho nivel de actividad con respecto a los valores para la misma actividad obtenidos de controles sanos.
- 60 15. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la enfermedad relacionada con la coagulación se selecciona entre el grupo que comprende: hemofilia; trombosis; deficiencia de protrombina heredada de tipo I o de tipo II; deficiencia de protrombina adquirida; síndrome de hipoprotrombinemia y enfermedad de von Willebrand.

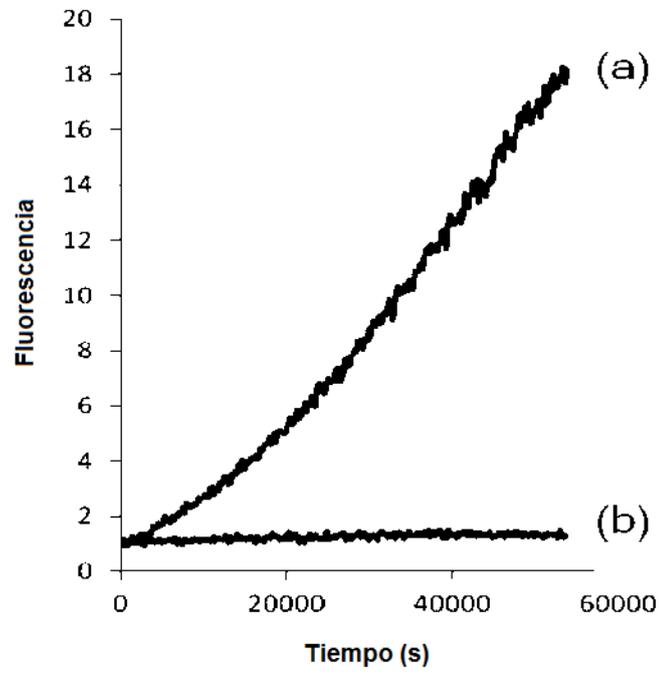
### Figura 1



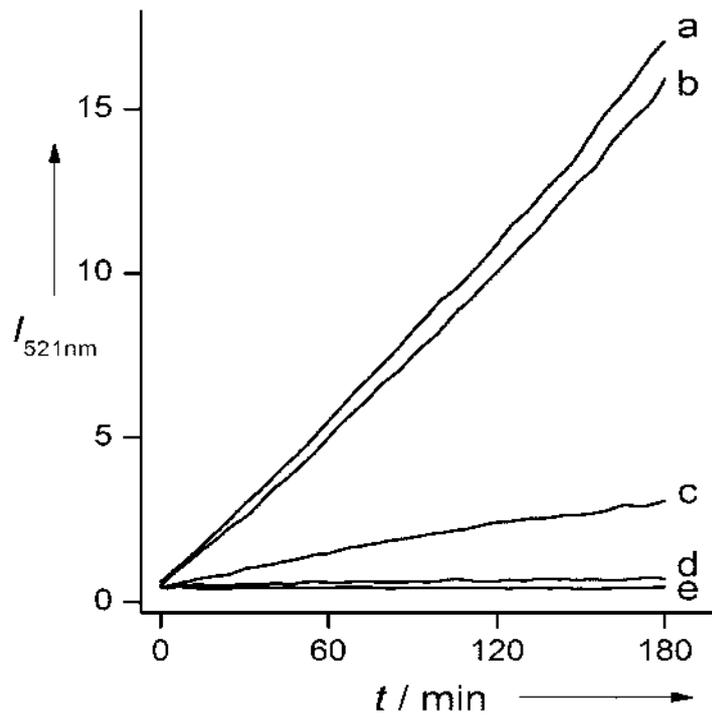
### Figura 2



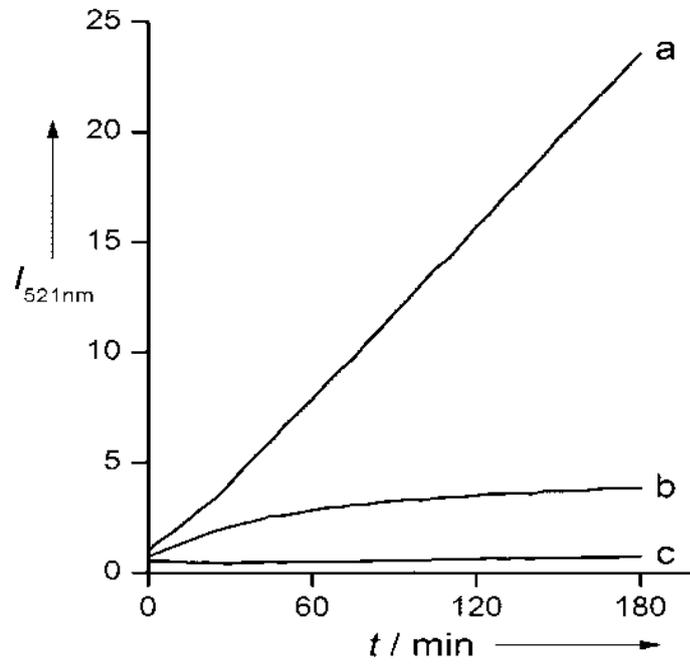
**Figura 3**



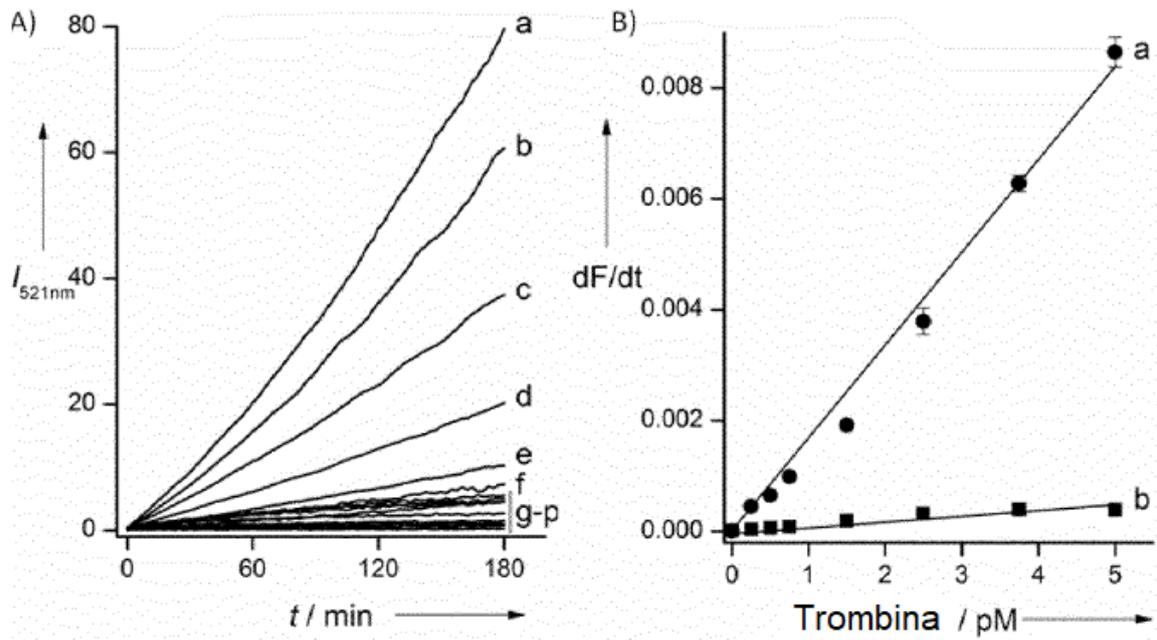
**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

