

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 973**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/56** (2006.01)  
**C07K 5/06** (2006.01)  
**C07K 5/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02781041 .5**  
96 Fecha de presentación: **06.12.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1551864**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

54 Título: **SUSTRATO PARA LA DETERMINACIÓN DE TAFI(A).**

30 Prioridad:  
**04.10.2002 WO PCT/CH02/00553**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.02.2012**

73 Titular/es:  
**DSM IP ASSETS B.V.**  
**HET OVERLOON 1**  
**6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:  
**ZIEGLER, Hugo;**  
**PRASA, Dagmar;**  
**STÜRZEBECKER, Jörg y**  
**WIKSTROEM, Peter**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireia**

**ES 2 374 973 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

Sustrato para la determinación de TAFI(a).

5 TAFI ("thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor", en castellano, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina) es una proenzima de 55 kDa, similar a la carboxipeptidasa B, que es activada por proteólisis en Arg-92 para dar la enzima TAFIa (35 kDa). A diferencia de la carboxipeptidasa B, que es activada como proenzima de 46 kDa por proteólisis en Arg-95 y actúa en el estómago y el tracto intestinal, TAFIa es una enzima del hígado, que despliega su actividad en la sangre.

10 El TAFIa se forma por trombina y probablemente también plasmina a partir de TAFI y es un inhibidor importante de la fibrinólisis. La activación de TAFI se refuerza en aproximadamente 1250 veces por unión de trombina a trombomodulina. El efecto inhibitor de TAFIa radica en su capacidad de escisión de las argininas y lisinas carboxi-terminales, siendo su especificidad mayor frente a la arginina.

15 El mismo TAFIa es muy sensible a las proteólisis y se vuelve inestable ya a los 37°C.

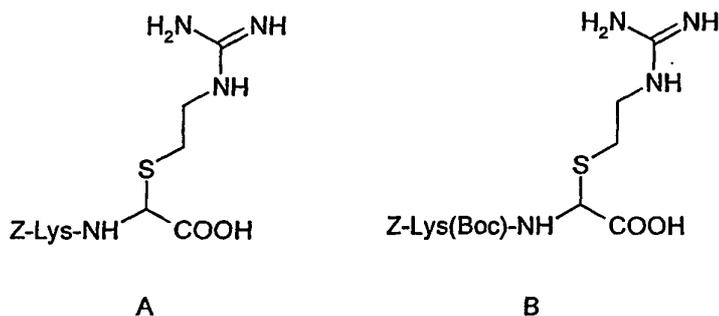
La fibrinólisis comienza cuando el plasminógeno es convertido por tPA en plasmina. A continuación, la plasmina degrada el coágulo de fibrina para formar productos de fibrina solubles, que por su parte contribuyen a una estimulación adicional de la formación de plasmina. TAFIa escinde las lisinas carboxi-terminales de dichos productos de fibrina, lo cual impide la formación del complejo de tPA/plasminógeno/fibrina, inhibiendo la fibrinólisis.

20 La medición de la concentración de TAFIa en el plasma proporciona un importante indicio acerca del riesgo de sangrado o trombosis de los pacientes.

25 Las carboxipeptidasas pueden analizarse a través de ensayos inmunológicos, tales como por ejemplo ELISA, que, sin embargo, no detectan la actividad de TAFI. Se han descrito ensayos funcionales en los que se hace reaccionar TAFIa con sustratos sintéticos del tipo R-Arg-COOH o R-Lys-COOH, liberando 'R' (por ejemplo hipurilo), que puede medirse por medio de HPLC o espectrofotometría en la región ultravioleta próxima.

30 Hasta la actualidad, existe sólo un ensayo por procedimiento cromogénico para la medición de TAFI y TAFIa en el plasma en placas microtítulo. Sin embargo, la formación de colorantes es demasiado compleja (de varias etapas) y se desarrolla de forma insatisfactoria. Puesto que la medición de la absorción se realiza a 490 nm, no es apto - igual que también los procedimientos descritos anteriormente - para la medición en aparatos convencionales, en los que los cambios de extinción tienen lugar a 405 nm.

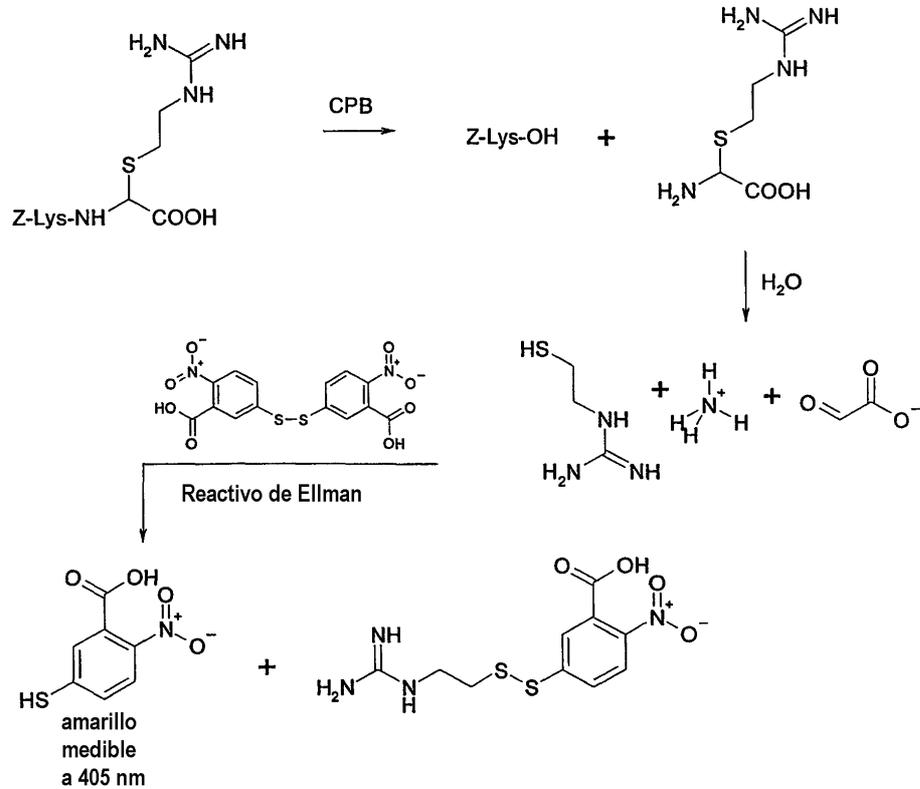
35 Los derivados de tiarginina de las siguientes fórmulas A y B



40 se han descrito como sustratos para la carboxipeptidasa B (Bull. Korean Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193). Dichos compuestos presentan tasas de escisión notables frente a la carboxipeptidasa B (CPB), mientras que por otro lado son escindidos apenas por TAFIa. La detección de CPB por medio del compuesto A se realiza según el siguiente esquema 1.

45

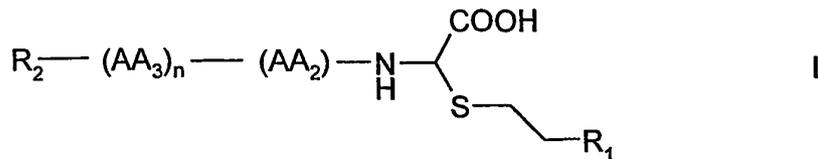
Esquema 1



Sorprendentemente, dicha selectividad ya puede revertirse a favor de TAFIa por medio de variaciones de estructura pequeñas.

5

La presente invención se refiere a la utilización de sustratos para TAFIa de la fórmula general I



10 en la que

R<sub>1</sub> es un grupo CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o NHC(NH)NH<sub>2</sub>,

15 AA<sub>2</sub> son cada uno lisina, ornitina, arginina o histidina sustituida o no sustituida, en las que los sustituyentes son grupos protectores convencionales,

AA<sub>3</sub> es un aminoácido natural en el que cualquier grupo protegible y presente en la cadena lateral puede estar sustituido por un grupo protector convencional,

20 n es 0 ó 1, y

R<sub>2</sub> es un grupo Bz, Bzl, Ac, Boc, Z, Suc, MeOSuc o Tos,

25 a condición de que no simultáneamente n sea 0 y R<sub>1</sub> sea NHC(NH)NH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> sea Z y (AA<sub>2</sub>) sea lisina sustituida por Boc o no sustituida,

como racematos o isómeros en forma de los enantiómeros puros,

y sus sales con ácidos inorgánicos u orgánicos.

30

Preferentemente, R<sub>1</sub> es NHC(NH)NH<sub>2</sub>.

Entre los ejemplos de posibles significados para AA<sub>2</sub>, se incluyen Lys(ε-Z), Lys(ε-Boc), Lys(ε-Ac), Lys(ε-Bz), Lys(ε-Bzl), Lys(ε-Tos), Orn(δ-Z), Orn(δ-Boc), Orn(δ-2-cloro-Z), Orn(δ-Dnp), Orn(δ-Z), Orn(δ-Aloc), Arg(ω-Pbf), Arg(δ,ω-Boc)<sub>2</sub>, Arg(δ,ω-Z)<sub>2</sub>, Arg(ω-Tos), His(N<sup>im</sup>-Boc), His(N<sup>im</sup>-Ac), His(N<sup>im</sup>-Bz), His(N<sup>im</sup>-Bzl) o His(N<sup>im</sup>-Tos), de los cuales se prefiere en particular Lys(ε-Z).

Entre los ejemplos de los grupos protectores aptos en el aminoácido AA<sub>3</sub>, se incluyen tBu, Bzl o Ac, prefiriéndose en particular los aminoácidos fenilalanina, alanina, serina y valina.

Preferentemente, R<sub>2</sub> es Bz o Boc.

Entre los ejemplos de sales aptas, se incluyen los hidrobromuros, hidroclouros, trifluoroacetatos o acetatos, prefiriéndose las sales de acetato, trifluoroacetato y hidrocloruro.

Las abreviaturas utilizadas anteriormente para los grupos protectores, así como una serie de otras abreviaturas se explicarán en una tabla incorporada entre los Ejemplos 2 y 3.

La invención se refiere también a los siguientes compuestos de la fórmula I definida en la reivindicación 1, en la que R<sub>1</sub> es NHC(NH)NH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, AA<sub>2</sub> es Lys(ε-Z) o Lys(ε-Boc), AA<sub>3</sub> es Ala, Ser, Phe, Val, Ser (Bzl) o Ser (Ac), n es 0 ó 1, R<sub>2</sub> es Bz, Boc o Z.

Los compuestos de la fórmula general I, que, con relación al átomo de carbono asimétrico provisto de un sustituyente que contiene azufre, pueden estar presentes como racematos o en una de sus formas de enantiómeros puros D y L, pueden prepararse según los procedimientos conocidos de por sí, que se describirán a continuación.

Los aminoácidos protegidos o derivados de oligopéptidos protegidos se convierten en las amidas de ácidos correspondientes, que a continuación se condensan a reflujo con un glioxilato de alquilo, ventajosamente de C<sub>1-6</sub>-alquilo, tal como glioxilato de etilo, según el procedimiento descrito por Hong, N.J. *et al.*, Bull. Korean Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193. Los derivados de hidroxiglicina resultantes se acetilan en O y se sustituyen por reacción con el compuesto de mercaptoalquilo correspondiente, tales como cisteamina, 3-mercaptopropilamina o bromuro de S-2-aminoetilisotiouonio. Los ésteres de alquilo obtenidos de los compuestos de la fórmula I se saponifican a continuación en condiciones alcalinas para dar los ácidos libres correspondientes. Los ácidos en forma de sus enantiómeros puros pueden obtenerse por medio de una hidrólisis enantioselectiva de los ésteres con la ayuda de enzimas aptas.

Los compuestos de la fórmula I y sus sales de adición con ácidos son aptos para el análisis de TAFIa. Dicho análisis puede llevarse a cabo según la invención haciendo reaccionar TAFIa con un compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 7 en presencia del ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), conocido bajo el nombre de "reactivo de Ellman", y determinando la absorción producida por la formación de 3-carboxi-4-nitrotiofenol entre 400 y 412 nm en función del tiempo por fotoespectrometría. La reacción mencionada se realiza a una temperatura comprendida ventajosamente entre 10°C y 37°C, preferentemente a temperatura ambiente, y el tiempo de reacción puede estar comprendido entre aproximadamente 5 y 15 minutos, siendo preferentemente de aproximadamente 10 minutos. La fuente utilizada para TAFIa puede ser el TAFI presente en el plasma sanguíneo.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención con mayor detalle sin limitar su alcance.

La identificación y caracterización de los eluados y productos obtenidos según los Ejemplos 1 y 2 se llevaron a cabo por medio de RMN de protones, HPLC/MS por electrospray y/o análisis elemental.

### Ejemplo 1

Preparación de la sal de hidrocloruro de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxicarbonil)-α-(D,L)-(2-guanidinoetil)glicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OH·HCl]

1A) Éster etílico de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxicarbonil)-α-(D,L)-hidroxiglicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-OH-OEt)]

Se calentaron 5,0 g (13 mmol) benzoil-(L)-lisinamida y una solución de tolueno al 50% de 13,3 g (65 mmol) de glioxilato de etilo en 100 ml de THF a reflujo. Después de 4 h, la solución se enfrió a TA y se trasladó directamente a la etapa de reacción 1B).

1B) Éster etílico de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxicarbonil)-α-(D,L)-acetoxiglicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-OAc)-OEt]

A la solución de reacción de 1A), se adicionaron 127 mg (1 mmol) de DMAP, 24,7 ml (0,31 mol) de piridina y 40 g (0,39 mol) de anhídrido acético, y la solución resultante se agitó a TA durante 90 min. La solución de reacción se filtró, pasándola por gel de sílice, el disolvente se eliminó por destilación y el producto crudo obtenido se secó en un armario de secado al vacío. Rendimiento: 14 g.

1C) Éster etílico de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxycarbonil)-α-(D,L)-(2-guanidinoetiltio)glicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OEt]

5 Se disolvieron 5,5 g (19,5 mmol) de hidrobromuro del bromuro de S-(2-aminoetil)isotiuronio y 4 g (39 mmol) de TEA en 50 ml de DMF y la solución resultante se agito a TA durante 5 min. A continuación, una solución de 14 g del producto obtenido en 1B) en 30 ml de DMF se adicionó. Después de agitar la solución 2 h a TA, el disolvente se eliminó por destilación en un evaporador rotativo. El producto crudo obtenido se cromatografió por medio de LH20 (metanol). El compuesto se obtiene como aceite amarillento. ESI-MS [M+H]-587.

1D) Sal de hidrocloreto de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxycarbonil)-α-(D,L)-(2-guanidinoetiltio)glicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-GUS)-OH·HCl]

15 Se disolvieron 3,1 g (4,4 mmol) del compuesto 1C) en 20 ml de etanol, a la solución se adicionaron 11 ml de NaOH (1 N) y la solución resultante se agitó a TA durante la noche. Después de ajustar el valor pH a 3 con ácido cítrico y eliminar el disolvente por destilación, el residuo se cromatografió por medio de LH20 (metanol). Para convertir el producto en la sal de hidrocloreto, las fracciones puras concentradas se disolvieron en 100 ml de una mezcla de metanol/agua (1:1) y la solución se cromatografió sobre Amberlite (forma Cl<sup>-</sup>). La solución obtenida se concentró en un evaporador rotativo, y el producto se precipitó como un polvo casi blanco, amorfo por adición de BME. El polvo se separó por filtración, se lavó con una pequeña cantidad de BME y se secó en un armario de secado al vacío.

Rendimiento: 2,5 g, ESI-MS [M+H]-559.

**Ejemplo 2**Preparación de la sal de trifluoroacetato de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxycarbonil)-α-(D,L)-(3-aminopropiltio)glicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SprA)-OH·TFA]2C) Sal de trifluoroacetato de etilo de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxycarbonil)-α-(D,L)-(3-aminopropiltio)glicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SprA)-OEt·TFA]

35 Se disolvieron 2,5 g (20 mmol) del hidrocloreto de 3-mercaptopropilamino y 2 g (20 mmol) de TEA en 40 ml de DMF, la solución se agitó a TA durante 5 min y se adicionó una solución de 6,9 g del producto obtenido en 1B) en 30 ml de DMF. Después de agitar la solución 2 horas a TA, el disolvente se eliminó por destilación en un evaporador rotativo. El producto crudo obtenido se purificó por medio de HPLC preparativo (ACN/H<sub>2</sub>O/TFA). Las fracciones puras se concentraron en un evaporador rotativo.

ESI-MS [M+H]-559.

2D) Sal de trifluoroacetato de benzoil-(L)-lisil-(ε-benciloxycarbonil)-α-(D,L)-(3-aminopropiltio)-glicina [Bz-(L)-Lys(Z)-(D,L)-Gly(α-SprA)-OH·TFA]

45 Se disolvieron 0,43 g (0,6 mmol) del compuesto 2C) en 7 ml de etanol, se adicionaron 2 ml de NaOH (1 N), y la solución resultante se agitó a TA durante la noche. La solución de reacción se ajustó en un valor pH de 3 con ácido cítrico al 10%, se extrajo 3 veces con 20 ml de acetato de etilo cada vez, y la fase orgánica se lavó 2 veces con una solución de NaCl saturada. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, y el disolvente se eliminó por destilación en un evaporador rotativo. El producto crudo se cromatografió por medio de HPLC preparativo (ACN/H<sub>2</sub>O/TFA). Las fracciones puras se concentraron en un evaporador rotativo, y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de metanol y se precipitó por adición de BME. El polvo casi blanco se separó por filtración, se lavó con una pequeña cantidad de BME y se secó en un armario de secado al vacío.

ESI-MS [M+H]- 531.

Abreviaturas

55

Ac	Acetil
ACN	Acetonitrilo
Aloc	Aliloxycarbonilo
BME	Éter de t-butilo y metilo
Boc	t-Butiloxycarbonilo
Bz	Benzoilo
Bzl	Bencilo
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina
DMF	N,N-dimetilformamida

(Continuación)

Dnp	2,4-Dinitrofenilo
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EtOAc	Acetato de etilo
GUS	2-Guanidionetilio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico
LH20	Sephadex
MeOSuc	Metoxisuccinilo
NAPAP	Piperidida de N $\alpha$ -(2-naftilsulfonilglicil)-4-amidinofenilalanina
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametildibenzohidrofurano-5-sulfonilo
SprA	3-Aminopropiltio
TA	Temperatura ambiente
Suc	Succinilo
tBu	terc.-Butilo
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Tos	Tosilo
Z	Benciloxicarbonilo

**Ejemplo 3**

5

**Análisis cuantitativo de TAFIa**

10 Principio: TAFIa se determinó según el esquema 1. En una primera etapa, el sustrato de TAFIa se hidrolizó de tal forma que se liberó un tioaminoácido (tiaarginina o tialisina). Dichos intermediarios inestables se degradaron rápidamente a 2-mercaptoethylguanidina y 3-mercaptopropilamina, respectivamente. Dichos compuestos mercapto reaccionaron rápidamente con el reactivo de Ellman (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)), liberando 3-carboxi-4-nitrotiofenol de color amarillo intenso, el cual puede medirse por fotoespectroscopia a 405-412 nm. El contenido de tiol libre medido es directamente proporcional a la cantidad del sustrato hidrolizado por TAFIa, permitiendo de esta forma un análisis cuantitativo de la actividad enzimática.

15 Ensayo de enzima: La medición de la actividad enzimática se llevó a cabo utilizando una solución madre del sustrato de 10 mM en DMSO a temperatura ambiente. TAFI de origen humano está disponible en una solución madre de 360  $\mu$ g/ml del Enzyme Research Laboratory o de un plasma sanguíneo. La activación de TAFI a TAFIa se llevó a cabo por medio de trombina (2,7 U/ml), cuya activación se efectuó con 30  $\mu$ g de trombomodulina. La actividad de trombomodulina excedente se eliminó por adición del inhibidor sintético NAPAP. La medición se realizó en placas de microtítulo.

20 El incremento de la absorción a 405-412 nm se registró durante 10 minutos.

**Activación:**

TAFI	20 $\mu$ l
Trombina (2,7 U/ml)	20 $\mu$ l
Trombomodulina (30 $\mu$ g/ml)	20 $\mu$ l

30 se incubaron en un tampón (HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, Tween 80 al 0,01%; pH 7,4) a 25°C durante 5 min

**Medición:**

Tampón (HEPES 20 mM, CaCl <sub>2</sub> 5 mM, Tween 80 al 0,01%; pH 7,4)	120 $\mu$ l
NAPAP (100 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
DTNB (5 mM)	10 $\mu$ l
Sustrato (10 mM)	20 $\mu$ l

40 se midieron a TA durante 10 min

**Resultados:**

- 45 - Escisión de sustratos de tiaarginina y tialisina (concentración final 174  $\mu$ M) por TAFIa (concentración final 17  $\mu$ g/ml)
- En paréntesis los valores para carboxipeptidasa B

- Sustancias de comparación A y B de "Bull. Korean Chem. Soc. 1998, 19(2), 189-193"

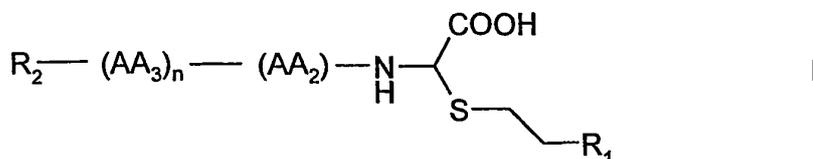
-  $\Delta E$  = cambio de extinción a 405 nm

5

No.	Substratos	$\Delta E/\text{min}$
4269	Bz-K(Z)-G(GUS)-OH x HCl	0,108 (0,018)
4273	Boc-K(Tos)-G(GUS)-OH x HCl	0,014 (0,048)
4275	Boc -K(Z)-G(GUS)-OH x TFA	0,041 (0,028)
4298	Boc-F-K(Boc)-G(GUS)-OH x HCl	0,043 (0,034)
4300	Bz-P-K(Boc)-G(GUS)-OH x TFA	0,012 (0,072)
4302	Z-A-K(Boc)-G(GUS)-OH x HCl	0,042 (0,059)
4334	Bz-V-G(GUS)-OH x TFA	0,034
4336	Bz-V-G( $\alpha$ -SPrA)-OH x TFA	0,053
4339	Bz-K(Z)-G( $\alpha$ -SPrA)-OH x TFA	0,055
4341	Boc-K(Z)-G( $\alpha$ -SPrA)-OH x TFA	0,054
	Sustancia de comparación A x HCl	0,002 (0,062)
	Sustancia de comparación B x HCl	0,016 (0,077)

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de compuestos de la fórmula general I



5

en la que

- 10  $R_1$  es un grupo  $\text{CH}_2\text{NH}_2$  o  $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  
 $AA_2$  son respectivamente lisina, ornitina, arginina o histidina sustituida o no sustituida, en las que los sustituyentes son grupos protectores convencionales,  
 $AA_3$  es un aminoácido natural, en el que cualquier grupo protegible presente en la cadena lateral puede estar sustituido por un grupo protector convencional,  
 $n$  es 0 ó 1, y  
 $R_2$  es un grupo Bz, Bzl, Ac, Boc, Z, Suc, MeOSuc o Tos,  
 20 a condición de que no simultáneamente  $n$  sea 0,  $R_2$  sea Z y ( $AA_2$ ) sea lisina sustituida por Boc, como racematos o isómeros en forma de enantiómeros puros,  
 25 y de sus sales con ácidos inorgánicos u orgánicos como sustratos para la determinación de TAFIa.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que  $AA_2$  es Lys( $\epsilon$ -Z), Lys( $\epsilon$ -Boc), Lys( $\epsilon$ -Ac), Lys( $\epsilon$ -Bz), Lys( $\epsilon$ -Bzl), Lys( $\epsilon$ -Tos), Orn( $\delta$ -Z), Orn( $\delta$ -Boc), Orn( $\delta$ -2-cloro-Z), Orn( $\delta$ -Dnp), Orn( $\delta$ -Z), Orn( $\delta$ -Aloc), Arg( $\omega$ -Pbf), Arg( $\delta,\omega$ -Boc)<sub>2</sub>, Arg( $\delta,\omega$ -Z)<sub>2</sub>, Arg( $\omega$ -Tos), His( $N^{\text{im}}$ -Boc), His( $N^{\text{im}}$ -Ac), His( $N^{\text{im}}$ -Bz), His( $N^{\text{im}}$ -Bzl) o His( $N^{\text{im}}$ -Tos), de los cuales se prefiere en particular Lys( $\epsilon$ -Z).

30

3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que  $AA_3$  es Ala, Ser, Phe, Val, Ile, Leu, Thr, Pro, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys, Met, Trp, Tyr o Gly, en la que cualquier grupo protegible presente en la cadena lateral puede estar sustituido por un grupo protector convencional, tal como tBu, Bzl o Ac.

35

4. Utilización según la reivindicación 3, en la que  $AA_3$  es Phe, Ala, Val o Ser protegido por tBu, Bzl o Ac o no protegido.

5. Utilización según la reivindicación 1, en la que

40

- $R_1$  es  $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  
 $AA_2$  es Lys( $\epsilon$ -Z) o Lys( $\epsilon$ -Boc),  
 $AA_3$  es Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) ó Ser(Ac),  
 $n$  es 0 ó 1 y  
 $R_2$  es Bz, Boc o Z.

45

6. Utilización según la reivindicación 1, en la que

- $R_1$  es  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  
 $AA_2$  es Lys( $\epsilon$ -Z) o Lys( $\epsilon$ -Boc),  
 $AA_3$  es Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) o Ser(Ac),  
 $n$  es 0 ó 1 y  
 $R_2$  es Bz, Boc o Z.

50

7. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque los compuestos están presentes como sales de adición con un ácido en forma de hidrobromuros, hidrocioruros, trifluoroacetatos o acetatos.

55

8. Compuestos de la fórmula I definida en la reivindicación 1, en la que

- $R_1$  es  $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  
 $AA_2$  es Lys( $\epsilon$ -Z) o Lys( $\epsilon$ -Boc),

60

AA<sub>3</sub> es Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu) o Ser(Ac),  
 n es 0 ó 1 y  
 R<sub>2</sub> es Bz, Boc o Z.

5 9. Compuestos de la fórmula I definida en la reivindicación 1, en la que

R<sub>1</sub> es CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,  
 AA<sub>2</sub> es Lys(ε-Z) o Lys(ε-Boc),  
 AA<sub>3</sub> es Ala, Ser, Phe, Val, Ser(tBu), Ser(Bzl) o Ser(Ac),  
 10 n es 0 ó 1 y  
 R<sub>2</sub> es Bz, Boc o Z.

10. Compuesto según la reivindicación 8, en el que AA<sub>2</sub> es Lys(ε-Z), n es 0 y R<sub>2</sub> es Bz.

15 11. Compuestos según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizados porque están presentes como sales de adición con un ácido en forma de hidrobromuros, hidroclouros, trifluoroacetatos o acetatos.

12. Utilización de los compuestos según una de las reivindicaciones 8 a 11 como sustratos para la determinación de TAFIa.

20 13. Procedimiento para el análisis de TAFIa, caracterizado porque TAFIa se hace reaccionar en presencia de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) con un compuesto de la fórmula I definida en la reivindicación 1 o según una de las reivindicaciones 8 a 11 y se determina la absorción producida por la formación de 3-carboxi-4-nitrotiofenol entre 400 y 412 nm en función del tiempo por fotospectroscopia.

25 14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 10°C y 37°C, en particular a temperatura ambiente, de 5 a 15 minutos, en particular durante 10 minutos.

30 15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque la fuente utilizada para TAFIa es el TAFI presente en el plasma sanguíneo.

35 16. Procedimiento según la reivindicación 15 para la determinación de TAFI en el plasma sanguíneo, caracterizado porque dicho TAFI se activa por medio de trombomodulina y la trombina unida a la misma para dar TAFIa, se elimina la actividad de trombina excedente por adición de NAPAP, el TAFIa resultante se hace reaccionar en presencia de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) con un compuesto de la fórmula I definida en la reivindicación 1 o según una de las reivindicaciones 8 a 11 y se determina la absorción producida por la formación de 3-carboxi-4-nitrotiofenol entre 400 y 412 nm en función del tiempo por fotospectroscopia.

40 17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque la cantidad de TAFI corresponde a 20 partes en volumen de una solución madre de 360 µg/ml, la cantidad de trombomodulina corresponde a 20 partes en volumen de una solución de 30 µg/ml, la cantidad de trombina corresponde a 20 partes en volumen de una solución de 2,7 U/ml, la cantidad de NAPAP corresponde a 20 partes en volumen de una solución de 100 µM/ml, la cantidad de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) corresponde a 10 partes en volumen de una solución de 5 mM/ml y la cantidad  
 45 del compuesto de la fórmula I definida en la reivindicación 1 o según una de las reivindicaciones 8 a 11 corresponde a 20 partes en volumen de una solución de 10 mM/ml.

50 18. Procedimiento para la preparación de los compuestos según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque se somete un éster alquílico correspondiente a una saponificación alcalina.