(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 578 479**

(51) Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010** **E 10769742 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2426488**

(54) Título: **Método de medición que usa sustancia de patrón interno**

(30) Prioridad:

28.04.2009 JP 2009109635

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2016

(73) Titular/es:

WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (100.0%)
1-2, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-8605, JP

(72) Inventor/es:

YAMAMOTO, NAOYUKI y
KUROSAWA, TATSUO

(74) Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 578 479 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).

MÉTODO DE MEDICIÓN QUE USA SUSTANCIA DE PATRÓN INTERNO

DESCRIPCIÓN

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de medición para detectar un analito que usa una sustancia de patrón interno.

Técnica anterior

En el método de electroforesis capilar, anteriormente se ha llevado a cabo para usar una clase de sustancia de patrón interno y especificar una posición aproximada de un analito usando un pico del mismo como marcador de punta (véase la bibliografía de patente 1). Sin embargo, cuando sólo se usa una clase de sustancia de patrón interno, las relaciones de posición entre picos de una sustancia de patrón interno y un analito pueden variar por la influencia de las condiciones de medición y las impurezas en una muestra. Por tanto, cuando se requiere especificar con buena precisión la posición de un analito, se ha usado un marcador de peso molecular.

Cuando un analito es ADN o ARN, también se conoce que la medición se lleva a cabo usando dos clases de marcadores de lado de alto peso molecular y lado de bajo peso molecular. El marcador de peso molecular que va a usarse en este caso es ADN o ARN, que se seleccionan basándose en el número de bases de los mismos. Es decir, cuando se lleva a cabo electroforesis de ADN o ARN, ha podido obtenerse el peso molecular del analito a partir de relaciones de posición con dos marcadores de peso molecular estableciendo con precisión posiciones de los marcadores de peso molecular. Sin embargo, el marcador de peso molecular que va a usarse en este caso es ADN, ARN o similar, que está marcado con un compuesto de intercalación, y tenía problemas tales como que la estabilidad era escasa; el marcador de peso molecular reaccionaba con una sustancia en una muestra cuando se usaba una muestra de suero; se aumentaba el fondo; el marcador de peso molecular mostraba un pico ancho; y similares.

Por otro lado, cuando un analito es una proteína o un compuesto, dado que la movilidad del analito varía dependiendo del peso molecular o la carga eléctrica del analito, habitualmente sólo se usa una clase de sustancia de patrón interno y el propósito del uso era especificar una posición aproximada del analito. Por tanto, en tal caso en el que se mide una proteína o un compuesto, actualmente se requiere el desarrollo de un método de medición que no tenga tales problemas en la medición de ADN o ARN tal como se describió anteriormente y que pueda especificar una proteína o un compuesto con buena precisión.

En particular, cuando se lleva a cabo electroforesis usando un capilar fino como en la electroforesis en microchip, ha existido un problema tal como que el tiempo de migración de una sustancia podía variar incluso en las mismas condiciones si se cambia chip por otro, debido a la finura del capilar. Por este motivo, algunas veces era difícil especificar el pico objetivo. Además, dado que se vuelve posible una medición de alta sensibilidad en el caso de tal método de medición, era esencial usar una sustancia de patrón interno que no influya sobre la medición y que pueda medir con buena sensibilidad. Por tanto, también se ha requerido el desarrollo de un método de medición que pueda especificar un pico de una sustancia de medición en las condiciones tal como se describieron anteriormente.

Bibliografía de la técnica anterior

Bibliografía de patente

Bibliografía de patente 1: documento JP-A-2007-24610

Divulgación de la invención

Problema que debe resolverse mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de medición que usa una sustancia de patrón interno en una electroforesis en el que un analito es una proteína o un compuesto.

Medios para resolver el problema

En estas circunstancias, los presentes inventores han estudiado intensamente para desarrollar un método de medición mediante un método de electroforesis capilar que usa una sustancia de patrón interno cuando un analito es una proteína o un compuesto. Como resultado, los inventores han encontrado que puede especificarse fácilmente un pico de un analito incluso cuando el analito es una proteína o un compuesto, usando como sustancia de patrón interno una combinación de un compuesto que tiene 3 o más grupos aniónicos en una molécula y un compuesto en el que de 1 a 3 grupos aniónicos de dicho compuesto se han sustituido por grupos catiónicos, o una combinación de un compuesto que tiene 3 o más grupos catiónicos en una molécula y un compuesto en el que de 1 a 3 grupos

catiónicos de dicho compuesto se han sustituido por grupos aniónicos. Es decir, en el método de electroforesis capilar en el que se migra una sustancia en un sentido desde el lado negativo hacia el lado positivo, dado que un pico de un compuesto que tiene 3 o más grupos aniónicos en una molécula se detecta en un momento anterior y un pico de un compuesto que tiene 3 o más grupos catiónicos en una molécula se detecta en un momento retardado, usando un compuesto que tiene 3 o más grupos catiónicos o aniónicos en una molécula y un compuesto en el que de 1 a 3 grupos aniónicos o catiónicos de dicho compuesto se han sustituido por el que tiene carga eléctrica opuesta, se vuelve posible ajustar un pico del analito para situarlo entre dos picos de las sustancias de patrón interno, mediante lo cual puede identificarse fácilmente un pico del analito. Basándose en estos hallazgos, se completó la presente invención.

El método de la presente invención se define en la reivindicación 1.

Efectos de la invención

Según la presente invención, se vuelve posible especificar un analito fácilmente y con buena precisión incluso cuando hay varios picos vecinos. Además, dado que la sustancia de marcaje que va a usarse en este caso no reacciona con una sustancia en la muestra o no ejerce ninguna influencia tal como aumentar el fondo y similares, se vuelve posible medir con buena precisión incluso en un análisis de un componente traza.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un dibujo que muestra el método para preparar un anticuerpo marcado con ADN en el ejemplo 1.

La figura 2 es un dibujo que muestra una disposición del chip capilar en el ejemplo 1.

La figura 3 es un dibujo que muestra esquemáticamente la disposición de una muestra para la migración y una disolución de prueba en el chip capilar en el ejemplo 1.

La figura 4 es un electroferograma en el que se midió AFP mediante el método de la presente invención en el ejemplo 1.

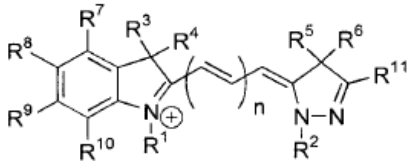
La figura 5 es un electroferograma en el que se midió PIVKA II mediante el método de la presente invención en el ejemplo 1.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

[Compuesto I que tiene 3 o más grupos aniónicos en una molécula relevante para la presente invención (abreviado algunas veces, a continuación en el presente documento, como compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención)].

El compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención es un compuesto que tiene habitualmente de 3 a 10 grupos aniónicos, preferiblemente de 5 a 8 grupos aniónicos, más preferiblemente de 5 a 6 grupos aniónicos, y de manera particularmente preferible 5 grupos aniónicos en una molécula. Cuando se lleva a cabo electroforesis en un sentido desde el lado negativo hacia el lado positivo, dado que la velocidad de migración de tal compuesto tal como se describió anteriormente se vuelve más rápida, un pico del mismo se detecta habitualmente en un momento anterior con respecto al de cualquier analito, y por tanto, el compuesto puede usarse como sustancia de patrón interno útil. El grupo aniónico descrito anteriormente incluye $-COO^-$ y $-SO_3^-$. COO^- es adecuado para introducir un grupo catiónico debido a su alta reactividad. Dado que $-SO_3^-$ puede aumentar la intensidad de fluorescencia, cuando el compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención descrito anteriormente se detecta mediante fluorescencia, es preferible tener dicho grupo. Debe observarse que un ejemplo específico del grupo aniónico descrito anteriormente puede ser aquél que se convierte en un grupo aniónico durante una electroforesis (al disolverse en una disolución de migración), y puede ser un ácido unido a un ion de hidrógeno o una sal tal como una sal de metal alcalino (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de rubidio), una sal de amonio, una sal de amonio orgánico (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de tripropilamonio) y similares.

Un ejemplo específico del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención incluye, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general [1] o una sal del mismo:



[1]

[en la que de R^1 a R^6 representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida;

de R^7 a R^{10} representan cada uno independientemente un grupo alquilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo alquilsulfonilo, un grupo arilsulfonilo, un grupo amino sustituido, $-COO^-$, $-SO_3^-$, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano o grupo nitro;

R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquinilo o un grupo arilo; y

n representa un número entero de desde 0 hasta 3;

y al menos 3 grupos de R^1 a R^{11} representan $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$].

El compuesto I descrito anteriormente representado por la fórmula general [1] o una sal del mismo es una sustancia fluorescente que tiene una longitud de onda de excitación a aproximadamente 635 nm, y que también muestra una forma de pico agudo cuando se hace migrar mediante una electroforesis capilar, y por tanto se convierte en una sustancia de patrón interno particularmente útil en una medición por electroforesis capilar mediante detección de fluorescencia.

$-COO^-$ o $-SO_3^-$ como sustituyente de un grupo alquilo representado por de R^1 a R^6 en la fórmula general [1] y $-COO^-$ o $-SO_3^-$ representado por de R^7 a R^{10} puede ser un grupo que se convierte en un grupo aniónico durante una electroforesis (al disolverse en una disolución de migración), y puede ser un ácido unido a un ion de hidrógeno, tal como ácido carboxílico (-COOH), ácido sulfónico ($-SO_3H$), o una sal tal como una sal de metal alcalino (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de rubidio), una sal de amonio, una sal de amonio orgánico (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de tripropilamonio).

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida, representado por de R^1 a R^6 en la fórmula general [1] puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico, pero es preferible uno de cadena lineal, que tiene habitualmente de C_1 a C_{10}, preferiblemente de C_1 a C_6, y más preferiblemente de C_1 a C_5. Específicamente, el grupo alquilo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo y similares. Entre ellos es preferible, por ejemplo, un grupo alquilo de cadena lineal tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo n-pentilo grupo.

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida, representado por de R^1 a R^6 incluye un grupo alquilo sustituido o no sustituido que no tiene un enlace amida, o un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene habitualmente de 1 a 10 enlaces amida, preferiblemente de 1 a 3 enlaces amida, y más preferiblemente un enlace amida en la cadena de alquilo del mismo.

Un ejemplo específico preferible del grupo alquilo no sustituido que puede tener un enlace amida incluye, por ejemplo, un grupo representado por la siguiente fórmula general [59]:

$$-T_1-(CONH-T_2)_k-R^{21} \qquad [59]$$

(en la que R^{21} representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo; T_1 y k fragmentos de T_2 representan un grupo alquileno; y k representa un número entero de desde 0 hasta 10).

El grupo alquilo representado por R^{21} en la fórmula general [59] puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico, que tiene habitualmente de C_1 a C_{10}, y preferiblemente de C_1 a C_6. Específicamente, el grupo alquilo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo neobutilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo; un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo

neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo y similares.

El grupo alquileno representado por T_1 y k fragmentos de T_2 puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico, que tiene de C_2 a C_{10}, y preferiblemente de C_2 a C_8. Específicamente, el grupo alquileno incluye un grupo alquileno de cadena lineal tal como, por ejemplo, un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo trimetileno, un grupo tetrametileno, un grupo pentametileno, un grupo hexametileno, un grupo heptametileno, un grupo octametileno, un grupo nonametileno, un grupo decametileno; un grupo alquileno ramificado tal como, por ejemplo, un grupo etilideno, un grupo propilideno, un grupo isopropilideno, un grupo 1-metiltrimetileno, un grupo 2-metiltrimetileno, un grupo 1,1-dimetiletileno, un grupo 1,2-dimetiletileno, un grupo etiletileno, un grupo 1-metiltetrametileno, un grupo 1,1-dimetiltrimetileno, un grupo 2,2-dimetiltrimetileno, un grupo 2-etiltrimetileno, un grupo 1-metilpentametileno, un grupo 2-metilpentametileno, un grupo 1,3-dimetiltetrametileno, un grupo 3-etiltetrametileno, un grupo 1-metilhexametileno, un grupo 1-metilheptametileno, un grupo 1,4-dietiltetrametileno, un grupo 2,4-dimetilheptametileno, un grupo 1-metiloctametileno, un grupo 1-metilnonametileno; y un grupo alquileno cíclico tal como, por ejemplo, un grupo ciclopropileno, un grupo 1,3-ciclobutileno, un grupo 1,3-ciclopentileno, un grupo 1,4-ciclohexileno, un grupo 1,5-cicloheptileno, un grupo 1,5-ciclooctileno, un grupo 1,5-ciclononileno, un grupo 1,6-ciclodecileno.

k representa habitualmente un número entero de desde 0 hasta 10, preferiblemente un número entero de desde 0 hasta 3, y más preferiblemente 0 ó 1.

Entre los ejemplos específicos de R^1 a R^6 en la fórmula general [1] descrita anteriormente, es particularmente preferible un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido. En cuanto a ejemplos específicos más preferibles, R^1 y R^2 son cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$ -, y más preferiblemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ de C_1 a C_5. En cuanto a R^3 y R^4, uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y preferiblemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ de C_1 a C_5, y el otro es un grupo alquilo no sustituido, preferiblemente un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5. En cuanto a R^5 y R^6, uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y preferiblemente un grupo alquilo que tiene como sustituyente $-COO^-$ o $-SO_3^-$ de C_1 a C_5, y el otro es un grupo alquilo no sustituido, preferiblemente un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5.

El grupo alquilo representado por de R^7 a R^{10} en la fórmula general [1] puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_1 a C_6, y preferiblemente de C_1 a C_3. Específicamente, el grupo alquilo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo y similares.

El grupo alquinilo representado por de R^7 a R^{10} incluye aquél de habitualmente C_2 a C_6, preferiblemente de C_2 a C_4, y específicamente, por ejemplo, un grupo etinilo, un grupo 2-propinilo, un grupo 3-butinilo, un grupo 1-metil-2-propinilo, un grupo 4-pentinilo, un grupo 2-metil-4-pentinilo, un grupo 5-hexinilo y similares.

El grupo arilo representado por de R^7 a R^{10} incluye aquél de habitualmente C_6 a C_{10}, y específicamente, por ejemplo, un grupo fenilo, un grupo naftilo y similares.

El grupo alcoxilo representado por de R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_1 a C_6, y preferiblemente de C_1 a C_3. Específicamente, el grupo alcoxilo incluye, por ejemplo, un grupo metoxilo, un grupo etoxilo, un grupo n-propoxilo, un grupo isopropoxilo, un grupo n-butoxilo, un grupo isobutoxilo, un grupo sec-butoxilo, un grupo terc-butoxilo, un grupo n-pentiloxilo, un grupo isopentiloxilo, un grupo sec-pentiloxilo, un grupo terc-pentiloxilo, un grupo neopentiloxilo, un grupo n-hexiloxilo, un grupo isohexiloxilo, un grupo sec-hexiloxilo, un grupo terc-hexiloxilo, un grupo neohexiloxilo, un grupo ciclopropoxilo, un grupo ciclopentiloxilo, un grupo ciclohexiloxilo y similares.

El grupo ariloxilo representado por de R^7 a R^{10} incluye aquél de habitualmente C_6 a C_{10}, y específicamente, por ejemplo, un grupo feniloxilo, un grupo naftoxilo y similares.

El grupo alquilsulfonilo de un grupo alquilsulfonilo representado por de R^7 a R^{10} incluye un grupo en el que el grupo -OH de un grupo sulfo ($-SO_3OH$) se ha sustituido por un grupo alquilo, y puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_1 a C_6. Específicamente, el grupo alquilsulfonilo incluye, por ejemplo, un grupo metilsulfonilo, un grupo etilsulfonilo, un grupo n-propilsulfonilo, un grupo isopropilsulfonilo, un grupo n-butilsulfonilo, un grupo isobutilsulfonilo, un grupo sec-butilsulfonilo, un grupo terc-butilfulfonilo, un grupo n-pentilsulfonilo, un grupo isopentilsulfonilo, un grupo sec-pentilsulfonilo, un grupo terc-pentilsulfonilo, un grupo neopentilsulfonilo, un grupo n-hexilsulfonilo, un grupo isohexilsulfonilo, un grupo sec-hexilsulfonilo, un grupo terc-hexilsulfonilo, un grupo neohexilsulfonilo, un grupo ciclopropilsulfonilo, un grupo ciclobutilsulfonilo, un grupo

ciclopentilsulfonilo, un grupo ciclohexilsulfonilo y similares.

El grupo arilsulfonilo representado por de R^7 a R^{10} incluye un grupo en el que el grupo -OH de un grupo sulfo (-SO_3OH) se ha sustituido por un grupo arilo, y puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_6 a C_{10}. Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo fenilsulfonilo, un grupo naftilsulfonilo y similares.

El átomo de halógeno representado por de R^7 a R^{10} incluye, por ejemplo, un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, un átomo de yodo y similares.

El grupo amino sustituido representado por de R^7 a R^{10} incluye un grupo en el que 1 ó 2 átomos de hidrógeno de un grupo amino se han sustituido por un sustituyente, y el sustituyente incluye, por ejemplo, un grupo alquilo, un grupo alcoxicarbonilo, un grupo acilo, un grupo sulfo y similares.

El grupo alquilo incluido como sustituyente del grupo amino sustituido representado por de R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_1 a C_{10}, y preferiblemente de C_1 a C_6. Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo y similares.

El grupo alcoxicarbonilo incluido como sustituyente del grupo amino sustituido representado por de R^7 a R^{10} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_1 a C_{10}, y preferiblemente de C_1 a C_6. Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metoxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo, un grupo n-propoxicarbonilo, un grupo isopropoxicarbonilo, un grupo n-butoxicarbonilo, un grupo isobutoxicarbonilo, un grupo sec-butoxicarbonilo, un grupo terc-butoxicarbonilo, un grupo n-pentiloxicarbonilo, un grupo isopentiloxicarbonilo, un grupo sec-pentiloxicarbonilo, un grupo terc-pentiloxicarbonilo, un grupo neopentiloxicarbonilo, un grupo n-hexiloxicarbonilo, un grupo isohexiloxicarbonilo, un grupo sec-hexiloxicarbonilo, un grupo terc-hexiloxicarbonilo, un grupo neohexiloxicarbonilo, un grupo n-heptiloxicarbonilo, un grupo isoheptiloxicarbonilo, un grupo sec-heptiloxicarbonilo, un grupo terc-heptiloxicarbonilo, un grupo neoheptiloxicarbonilo, un grupo n-octiloxicarbonilo, un grupo isooctiloxicarbonilo, un grupo sec-octiloxicarbonilo, un grupo terc-octiloxicarbonilo, un grupo neooctiloxicarbonilo, un grupo n-noniloxicarbonilo, un grupo isononiloxicarbonilo, un grupo sec-noniloxicarbonilo, un grupo terc-noniloxicarbonilo, un grupo neononiloxicarbonilo, un grupo n-deciloxicarbonilo, un grupo isodeciloxicarbonilo, un grupo sec-deciloxicarbonilo, un grupo terc-deciloxicarbonilo, un grupo neodeciloxicarbonilo, un grupo ciclopoxicarbonilo, un grupo ciclobutoxicarbonilo, un grupo ciclopentiloxicarbonilo, un grupo ciclohexiloxicarbonilo, un grupo cicloheptiloxicarbonilo, un grupo ciclooctiloxicarbonilo, un grupo ciclononiloxicarbonilo, un grupo ciclodeciloxicarbonilo y similares.

El grupo acilo incluido como sustituyente del grupo amino sustituido representado por de R^7 a R^{10} incluye, por ejemplo, un grupo derivado de un ácido carboxílico alifático, un grupo derivado de un ácido carboxílico aromático y similares.

Dicho grupo acilo derivado de un ácido carboxílico alifático puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico, y puede tener además un doble enlace en una cadena, y tiene habitualmente de C_2 a C_{20}, preferiblemente de C_2 a C_{15}, más preferiblemente de C_2 a C_{10}, y de manera adicionalmente más preferible de C_2 a C_6. Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo acetilo, un grupo propionilo, un grupo butirilo, un grupo isobutirilo, un grupo valerilo, un grupo isovalerilo, un grupo pivaloilo, un grupo hexanoilo, un grupo heptanoilo, un grupo octanoilo, un grupo decanoilo, un grupo lauroilo, un grupo miristoilo, un grupo palmitoilo, un grupo estearoilo, un grupo icosanoilo, un grupo acriloilo, un grupo metacriloilo, un grupo crotonoilo, un grupo oleoilo y similares.

Dicho grupo acilo derivado de un ácido carboxílico aromático incluye un grupo de habitualmente C_7 a C_{15}, y preferiblemente de C_7 a C_{11}, y específicamente, por ejemplo, un grupo benzoilo, un grupo naftoilo, un grupo antoilo y similares.

Entre los ejemplos específicos de R^7 a R^{10} en la fórmula general [1] descrita anteriormente, se prefiere particularmente $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o un átomo de hidrógeno. Ejemplos específicos más preferibles son un caso en el que 3 grupos de R^7 a R^{10} son átomos de hidrógeno y uno restante es $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y preferiblemente $-SO_3^-$.

El grupo alquilo representado por R^{11} en la fórmula general [1] puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico, y preferiblemente uno de cadena lineal, y tiene habitualmente de C_1 a C_{10}, preferiblemente de C_1 a C_6, y más preferiblemente de C_1 a C_3. Específicamente, el grupo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo

etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo y similares.

El grupo alquinilo representado por R^{11} incluye un grupo de habitualmente C_2 a C_6, y preferiblemente de C_2 a C_4, y específicamente, por ejemplo, un grupo etinilo, un grupo 2-propinilo, un grupo 3-butinilo, un grupo 1-metil-2-propinilo, un grupo 4-pentinilo, un grupo 2-metil-4-pentinilo, un grupo 5-hexinilo y similares.

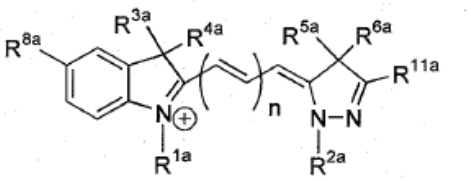
El grupo arilo representado por R^{11} incluye un grupo de habitualmente C_6 a C_{10}, y específicamente, por ejemplo, un grupo fenilo, un grupo naftilo y similares.

Entre los ejemplos específicos de R^{11} en la fórmula general [1] descrita anteriormente, un grupo alquilo es particularmente preferible.

n en la fórmula general [1] representa habitualmente un número entero de desde 0 hasta 3, preferiblemente 1 ó 2, y más preferiblemente 2.

Al menos 3 grupos de R^1 a R^{11} en la fórmula general [1] son $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$ -, y es preferible un caso en el que al menos un grupo es $-COO^-$ o un grupo que tiene como sustituyente $-COO^-$ y al menos dos grupos son $-SO_3^-$ o un grupo que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$, y es particularmente preferible un caso en el que al menos un grupo es $-COO^-$ o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ y cuatro grupos son $-SO_3^-$ o un grupo que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$.

Entre el compuesto I representado por la fórmula [1] de la presente invención, es preferible, por ejemplo, un compuesto representado por la siguiente fórmula general [1a]:



[1a]

(en la que de R^{1a} a R^{6a} representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no está sustituido; R^{8a} representa $-SO_3^-$, R^{11a} representa un grupo alquilo; n representa lo mismo que anteriormente; y dos grupos de R^{1a} a R^{6a} son $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$).

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$ -, o que no está sustituido representado por de R^{1a} a R^{6a} en la fórmula general [1a] incluye los mismos grupos que los mostrados a modo de ejemplo para el grupo alquilo mencionado anteriormente de un grupo alquilo sustituido o no sustituido que puede tener un enlace amida representado por de R^1 a R^6 en la fórmula general [1], y grupos preferibles son los mismos que anteriormente.

En cuanto a R^{1a} y R^{2a}, son preferibles grupos alquilo que tienen cada uno independientemente, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y son más preferibles grupos alquilo que tienen, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ de C_1 a C_5.

R^{3a} y R^{4a} son grupos alquilo que tienen cada uno independientemente, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no están sustituidos. Entre estos grupos, es preferible un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo no sustituido, y es más preferible un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ de C_1 a C_5, y el otro es un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5.

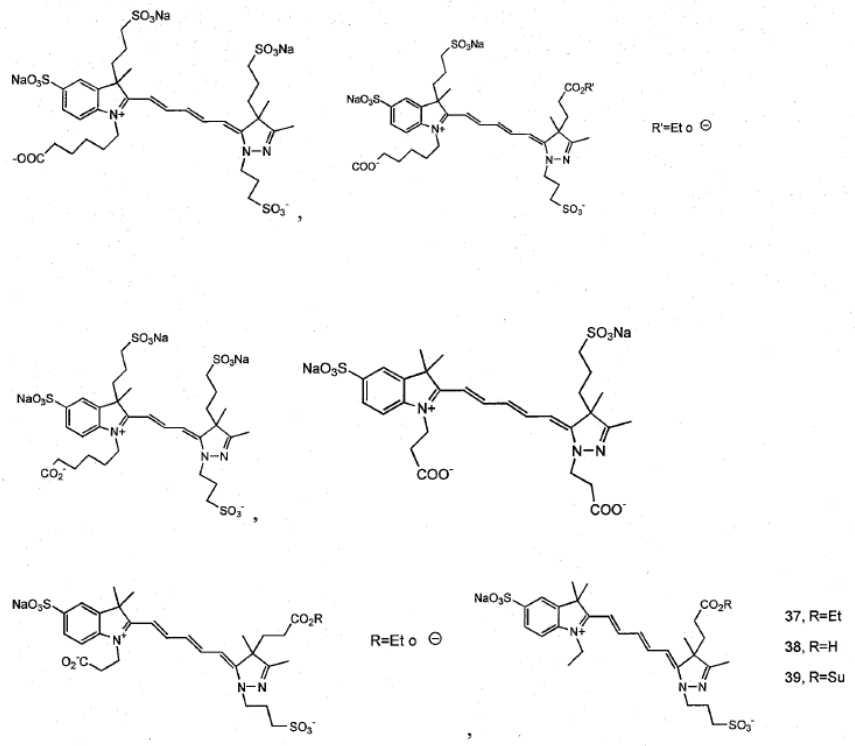
R^{5a} y R^{6a} son grupos alquilo que tienen cada uno independientemente, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no están sustituidos. Entre estos grupos, es preferible un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo, y es más preferible un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo de C_1 a C_5.

El grupo alquilo representado por R^{11a} incluye los mismos grupos que los mostrados a modo de ejemplo para el

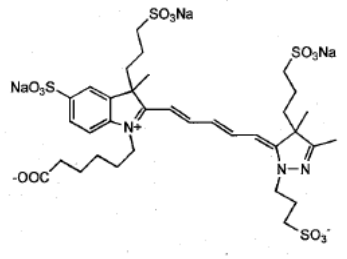
grupo alquilo mencionado anteriormente representado por R^{11} en la fórmula general [1], y grupos preferibles son los mismos que anteriormente.

Al menos dos grupos de R^{1a} a R^{6a} en la fórmula general [1a] son $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o grupos que tienen, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y es preferible un caso en el que al menos un grupo es $-COO^-$ o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ y al menos un grupo es $-SO_3^-$ o un grupo que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$, y es particularmente preferible un caso en el que un grupo es $–COO^-$ o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ y tres grupos son $-SO_3^-$ o grupos que tienen como sustituyente $-SO_3^-$.

Los ejemplos específicos preferibles del compuesto I representado por la fórmula general [1] incluyen, por ejemplo, los siguientes compuestos:



y, entre ellos, es preferible el siguiente compuesto:



[Método de síntesis del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención]

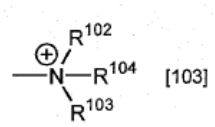
La fórmula general [1] descrita anteriormente puede sintetizarse apropiadamente, por ejemplo, según el método descrito en el documento WO 2007/114398.

[El compuesto II en el que de 1 a 3 grupos de grupo aniónico del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención se han sustituido por grupos catiónicos (abreviado algunas veces, a continuación en el presente documento, como compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención)]

El compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención tiene la misma estructura principal que la del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención, en el que de 1

a 3 grupos, y preferiblemente de 1 a 2 grupos de los grupos aniónicos se han sustituido por grupos catiónicos. Debido a esta estructura, cuando este compuesto II se hace migrar electroforéticamente en un sentido desde el lado negativo hacia el lado positivo, se vuelve posible retardar el tiempo de migración de este compuesto II con respecto al del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención. Es decir, cuando el compuesto I en el que de 1 a 3 grupos aniónicos se han sustituido por grupos catiónicos dependiendo del tiempo de migración de un analito y el compuesto II que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención se usan como sustancias de patrón interno en un estado apropiadamente combinado, se vuelve posible que se permita situar un pico del analito entre picos de las dos sustancias de patrón interno.

El grupo catiónico de la presente invención se representa mediante la siguiente fórmula general [103]:



[103]

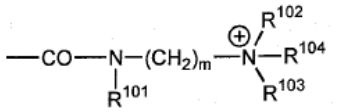
(en la que de R^{102} a R^{104} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C_1 a C_3; y de 2 a 3 grupos de R^{102} a R^{104} junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un catión de amonio heterocíclico).

El grupo alquilo de C_1 a C_3 representado por de R^{102} a R^{104} en el grupo representado por la fórmula general [103] puede ser cualquiera de uno de cadena lineal o ramificado, y es preferiblemente uno de cadena lineal. Específicamente, el grupo alquilo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo y similares. Entre ellos, son preferibles un grupo metilo y un grupo etilo, y es más preferible un grupo metilo.

El grupo catiónico de amonio heterocíclico que se forma mediante de 2 a 3 grupos de R^{102} a R^{104} junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos incluye, por ejemplo, un grupo piridinio, un grupo piperidinio, y un grupo piridinio sustituido con un grupo alquilo de C_1 a C_3.

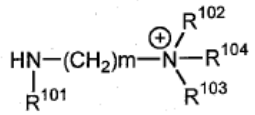
Un ejemplo específico del grupo representado por la fórmula general [103] incluye, por ejemplo, un grupo dietilamonio, un grupo dimetilamonio, un grupo metiletilamonio, un grupo trimetilamonio, un grupo trietilamonio, un grupo dietilmetilamonio, un grupo etildimetilamonio, un grupo piridinio, un grupo piperidinio, un grupo N-metilpiperidinio, un grupo N-etilpiperidinio, un grupo N-n-propilpiperidinio, un grupo N-isopropilpiperidinio y similares. Entre ellos, son preferibles un grupo dietilamonio y un grupo dimetilamonio, y es más preferible un grupo dimetilamonio.

Un ejemplo específico del grupo que contiene la fórmula general [103] en el extremo terminal incluye un grupo representado por la siguiente fórmula general [101]:



[101]

(en la que de R^{101} a R^{104} son los mismos que anteriormente). El grupo representado por la fórmula general [101] puede obtenerse, por ejemplo, haciendo reaccionar $-COO^-$ con un compuesto representado por la siguiente fórmula general [102]:



[102]

(en la que de R^{101} a R^{104} son los mismos que anteriormente; y m representa un número entero de desde 2 hasta 6), y haciéndose reaccionar de esta manera, puede sustituirse el grupo aniónico por el grupo catiónico.

El grupo alquilo de un grupo alquilo de C_1 a C_3 representado por de R^{101} a R^{104} en las fórmulas generales [101] y [102] es el mismo que el de un grupo alquilo de C_1 a C_3 representado por de R^{102} a R^{104} en la fórmula general [103] descritas anteriormente, y los grupos preferibles son los mismos que anteriormente.

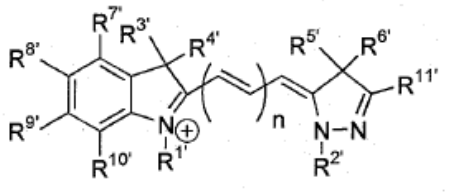
El grupo catiónico de amonio heterocíclico formado mediante de 2 a 3 grupos de R^{102} a R^{104} junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos incluye, por ejemplo, un grupo piridinio, un grupo piperidinio, un grupo piperidinio sustituido con un grupo alquilo de C_1 a C_3 tal como, por ejemplo, un grupo N-metilpiperidinio, un grupo N-

etilpiperidinio, un grupo N-n-propilpiperidinio, un grupo N-isopropilpiperidinio.

m en las fórmulas generales [101] y [102] es habitualmente de 2 a 6, preferiblemente de 2 a 4, y de manera particularmente preferible 2.

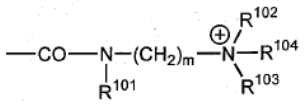
Un ejemplo específico preferible de un grupo representado por la fórmula general [101] incluye, por ejemplo, un grupo dimetilamonioetilcarbamoilo, un grupo trimetilamonioetilcarbamoilo, un grupo dietilamonioetilcarbamoilo, un grupo trietilamonioetilcarbamoilo, un grupo dimetilamoniopropilcarbamoilo, un grupo trimetilamoniopropilcarbamoilo, un grupo diisopropilamoniopropilcarbamoilo, un grupo triisopropilamoniopropilcarbamoilo, un grupo piridinioetilcarbamoilo, un grupo piridiniopropilcarbamoilo, un grupo metilpiperidinioetilcarbamoilo, un grupo metilpiperidiniopropilcarbamoilo, un grupo etilpiperidinioetilcarbamoilo, un grupo etilpiperidiniopropilcarbamoilo y similares. Entre ellos, son preferibles un grupo dimetilamonioetilcarbamoilo y un grupo dietilamonioetilcarbamoilo, además es más preferible un grupo dimetilamonioetilcarbamoilo.

El compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención incluye, por ejemplo, un compuesto II' representado por la fórmula general [1'] o una sal del mismo:



[1']

[en la que de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo representado por la fórmula general [101]:



[101]

(en la que de R^{101} a R^{104} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C_1 a C_3; y m representa un número entero de desde 2 hasta 6), o un grupo alquilo que tiene como sustituyente $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida;

de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo alquilsulfonilo, un grupo arilsulfonilo, un grupo amino sustituido, $-COO^-$, $-SO_3^-$, un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano o un grupo nitro;

$R^{11'}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquinilo o un grupo arilo; n representa un número entero de desde 0 hasta 3.

Al menos uno de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]].

El compuesto II' descrito anteriormente representado por la fórmula general [1'] o una sal del mismo es una sustancia fluorescente que tiene una longitud de onda de excitación a aproximadamente 635 nm, y que también muestra una forma de pico agudo cuando se hace migrar mediante una electroforesis capilar, y por tanto se convierte en una sustancia de patrón interno particularmente útil en una medición por electroforesis capilar mediante detección de fluorescencia.

$-COO^-$ o $-SO_3^-$ como sustituyente de un grupo alquilo representado por de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ en la fórmula general [1'] y $-COO^-$ o $-SO_3^-$ representado por de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ puede ser un grupo que se convierte en un grupo aniónico durante una electroforesis (al disolverse en una disolución de migración), y puede ser un ácido unido a un ion de hidrógeno tal como ácido carboxílico (-COOH), ácido sulfónico ($-SO_3H$) o una sal tal como una sal de metal alcalino (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de rubidio), una sal de amonio, una sal de amonio orgánico (por ejemplo, una sal de trimetilamonio, una sal de trietilamonio, una sal de tripropilamonio) y similares.

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101] y un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido que puede tener un enlace amida, representado por de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ en la fórmula general [1'] incluye los mismos grupos que el grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido que puede tener un enlace amida, representado por de R^1 a R^6 en la fórmula general [1], y los grupos preferibles son los mismos que anteriormente.

Un ejemplo específico preferible de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ en la fórmula general [1'] incluye un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], o un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido. Ejemplos específicos más preferibles de $R^{1'}$ y $R^{2'}$ son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, preferiblemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$, y más preferiblemente un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], y preferiblemente un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]. Ejemplos específicos más preferibles de $R^{3'}$ y $R^{4'}$ son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, preferiblemente un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$ -, y el otro es un grupo alquilo no sustituido, preferiblemente un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5. Ejemplos específicos más preferibles de $R^{5'}$ y $R^{6'}$ son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, preferiblemente un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo no sustituido, preferiblemente un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5.

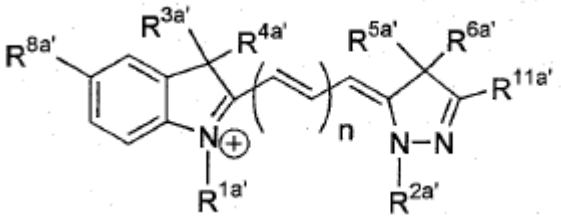
Un ejemplo específico y preferible del grupo alquilo, el grupo alquinilo, el grupo arilo, el grupo alcoxilo, el grupo ariloxilo, el grupo alquilsulfonilo, el grupo arilsulfonilo, el grupo amino sustituido, $-COO^-$, $-SO_3^-$, el átomo de halógeno representado por de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ en la fórmula general [1'] son los mismos que los descritos para de R^7 a R^{10} en la fórmula general [1], respectivamente. Además, un ejemplo específico preferible de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ en la fórmula general [1'] incluye $-COO^-$, $-SO_3^-$ o un átomo de hidrógeno. Un ejemplo específico más preferible es un caso en el que 3 grupos de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ son átomos de hidrógeno, y uno restante es $-COO^-$ o $-SO_3^-$, preferiblemente $-SO_3^-$.

Ejemplos específicos y preferibles del grupo alquilo, el grupo alquinilo y el grupo arilo representado por $R^{11'}$ en la fórmula general [1'] son los mismos que los descritos para R^{11} en la fórmula general [1]. Además, un ejemplo específico preferible de $R^{11'}$ en la fórmula general [1'] incluye un grupo alquilo.

n en la fórmula general [1'] es habitualmente un número entero de desde 0 hasta 3, preferiblemente 1 ó 2, y más preferiblemente 2.

En la fórmula general [1'], al menos uno de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], y preferiblemente uno de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], y de manera particularmente preferible $R^{1'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]. Debe observarse que cuando el compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención es un compuesto representado por la fórmula general [1] y contiene un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$, preferiblemente el $-COO^-$ se sustituye por un grupo representado por la fórmula general [101] para convertirse en un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101].

En la fórmula general [1'], preferiblemente al menos 2 grupos de $R^{1'}$ a $R^{11'}$ son $-COO^-$ o

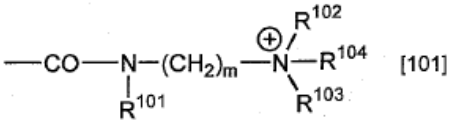


[1a']

$-SO_3^-$, o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, más preferiblemente 3 grupos son $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o un grupo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y de manera particularmente preferible 3 grupos son $-SO_3^-$, o un grupo que tiene, como sustituyente, este grupo.

Entre el compuesto II' representado por la fórmula general [1'] relevante para la presente invención, es preferible, por ejemplo, el compuesto representado por la siguiente fórmula general [1a']:

(en la que de $R^{1a'}$ a $R^{6a'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]:



[101]

(en la que de R^{101} a R^{104} son los mismos que anteriormente), o un grupo alquilo que tiene como sustituyente $-COO^-$ o $-SO_3$ -, o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida;

$R^{8a'}$ representa $-SO_3^-$; $R^{11a'}$ representa un grupo alquilo; m es el mismo que anteriormente.

Al menos uno de $R^{1a'}$ a $R^{6a'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]).

El grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], o un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no está sustituido que puede tener un enlace amida, representado por de $R^{1a'}$ a $R^{6a'}$ en la fórmula general [1a'] incluye el mismo grupo que el grupo alquilo de un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no está sustituido que puede tener un enlace amida, representado por de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ en la fórmula general [1'], y un grupo preferible es el mismo que anteriormente.

Ejemplos preferibles de $R^{1a'}$ y $R^{2a'}$ son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, preferiblemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], y ejemplos más preferibles son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo de C_1 a C_5 representado por la fórmula general [101].

$R^{3a'}$ y $R^{4a'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido. Entre ellos, ejemplos preferibles son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ y el otro es un grupo alquilo no sustituido, y ejemplos más preferibles son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5.

$R^{5a'}$ y $R^{6a'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido. Entre ellos, ejemplos preferibles son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ y el otro es un grupo alquilo no sustituido, y ejemplos más preferibles son un caso en el que uno cualquiera de los mismos es un grupo alquilo de C_1 a C_5 que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro es un grupo alquilo no sustituido de C_1 a C_5.

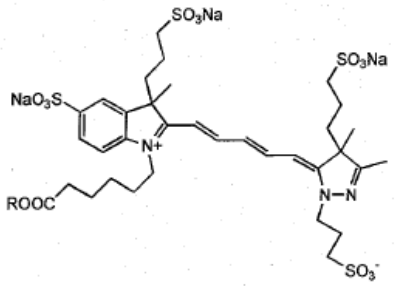
El grupo alquilo representado por $R^{11a'}$ incluye el mismo grupo que el mostrado a modo de ejemplo para un grupo alquilo representado por R^{11} en la fórmula general [1] mencionada anteriormente, y un grupo preferible es el mismo que anteriormente.

En la fórmula general [1a'], al menos un grupo de $R^{1a'}$ a $R^{6a'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101], y preferiblemente al menos $R^{1a'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101].

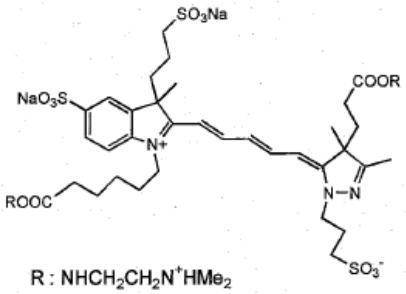
En la fórmula general [1a'], preferiblemente al menos un grupo de $R^{1a'}$ a $R^{6a'}$ es $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, más preferiblemente dos grupos son $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o grupos alquilo que tienen, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y de manera particularmente preferible dos grupos son $-SO_3^-$, o grupos alquilo que tienen, como sustituyente, este grupo.

n en la fórmula general [1a'] es habitualmente un número entero de desde 0 hasta 3, y preferiblemente 1 ó 2.

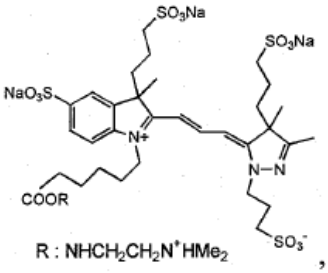
Un ejemplo específico preferible de la fórmula general [1'] incluye, por ejemplo, los siguientes compuestos:



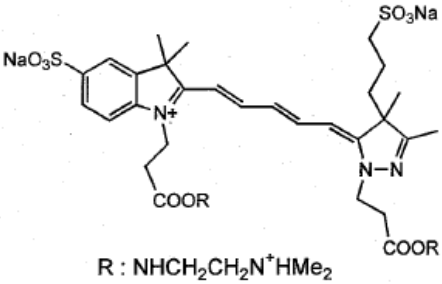
R : $NHCH_2CH_2NMe_2$,



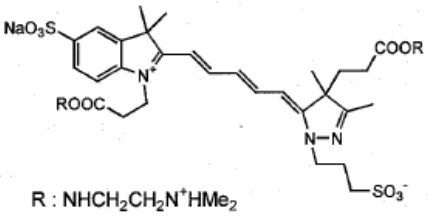
R : $NHCH_2CH_2N^+HMe_2$



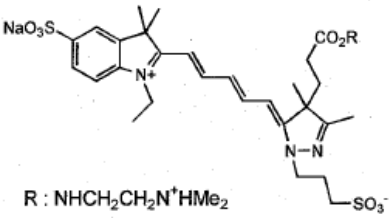
R : $NHCH_2CH_2N^+HMe_2$,



R : $NHCH_2CH_2N^+HMe_2$

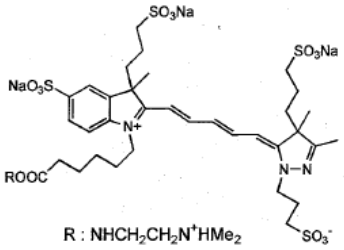


R : $NHCH_2CH_2N^+HMe_2$



R : $NHCH_2CH_2N^+HMe_2$

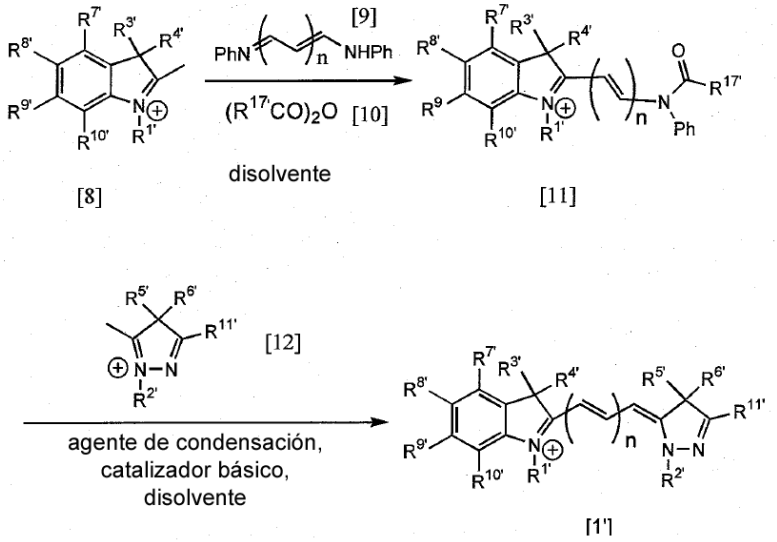
y, entre ellos, es preferible el siguiente compuesto:



R : $NHCH_2CH_2N^+HMe_2$

[Método de síntesis del compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención]

El compuesto II' representado por la fórmula general [1'] puede sintetizarse, por ejemplo, usando un compuesto de indolenina y un compuesto de pirazol según el siguiente método



(en el que $R^{17'}$ representa un grupo alquilo o un grupo arilo; de $R^{1'}$ a $R^{11'}$ y n representan lo mismo que anteriormente).

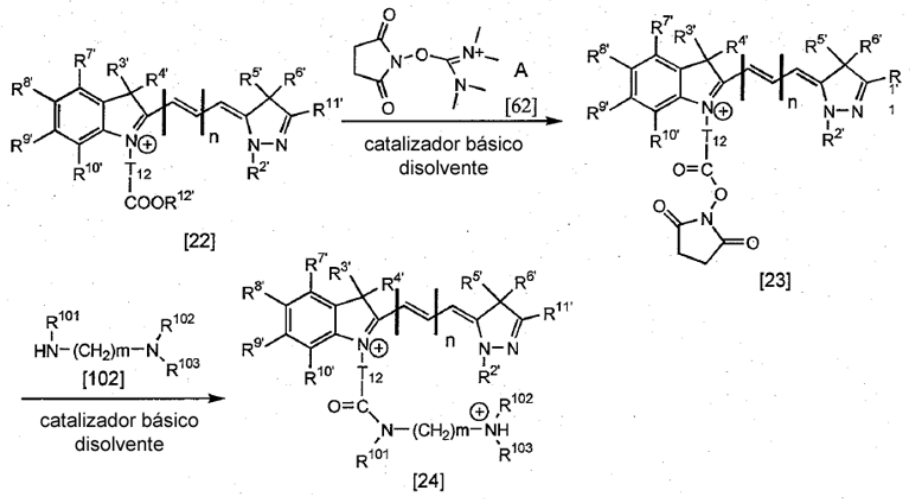
En las fórmulas generales [10] y [11], el grupo alquilo representado por $R^{17'}$ puede ser cualquiera de uno de cadena lineal, ramificado o cíclico de habitualmente C_1 a C_{10}, y preferiblemente de C_1 a C_3. Específicamente, el grupo alquilo incluye, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo; un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo n-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo neopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo sec-hexilo, un grupo terc-hexilo, un grupo neohexilo, un grupo n-heptilo, un grupo isoheptilo, un grupo sec-heptilo, un grupo terc-heptilo, un grupo neoheptilo, un grupo n-octilo, un grupo isooctilo, un grupo sec-octilo, un grupo terc-octilo, un grupo neooctilo, un grupo n-nonilo, un grupo isononilo, un grupo sec-nonilo, un grupo terc-nonilo, un grupo neononilo, un grupo n-decilo, un grupo isodecilo, un grupo sec-decilo, un grupo terc-decilo, un grupo neodecilo, un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo, un grupo ciclohexilo, un grupo cicloheptilo, un grupo ciclooctilo, un grupo ciclononilo, un grupo ciclodecilo y similares.

El grupo arilo representado por $R^{17'}$ incluye aquél de habitualmente C_6 a C_{10}, y específicamente, por ejemplo, un grupo fenilo, un grupo naftilo y similares.

Es decir, en primer lugar se disuelven un compuesto de indolenina representado por la fórmula general [8] (parte de la estructura de indolenina), un compuesto representado por la fórmula general [9] [de 1 a 2 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [8]], y un anhídrido de ácido representado por la fórmula general [10] [de 1 a 20 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [8]] (por ejemplo, anhídrido acético, anhídrido propiónico, anhídrido butírico, anhídrido benzoico y similares) en un disolvente (ácido carboxílico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico; nitrilos tales como, por ejemplo, acetonitrilo, propionitrilo, n-butironitrilo) si es necesario, y se hace reaccionar la disolución a de 0 a 150ºC (preferiblemente de 40 a 120ºC) durante de 0,1 a 24 horas (preferiblemente de 0,5 a 12 horas, y más preferiblemente de 1 a 8 horas), para obtener el compuesto representado por la fórmula general [11].

Posteriormente, se hacen reaccionar el compuesto representado por la fórmula general [11] y un compuesto representado por la fórmula general [12] (una parte de estructura de pirazol) [de 0,5 a 10 veces, preferiblemente de 1 a 5 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [11]] en presencia de un catalizador básico (aminas orgánicas tales como, por ejemplo, piridina, trietilamina, N,N-dimetilanilina, piperidina, 4-dimetilaminopiridina, 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno, 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno, tri-n-butilamina; hidruros de metales tales como, por ejemplo, hidruro de sodio; compuestos básicos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, n-butil-litio), usando un agente de condensación de deshidratación [agentes de deshidratación inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado, pentóxido de fósforo, cloruro de zinc anhidro; carbodiimidas tales como, por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilcarbodiimida); anhídrido acético; poli(ácido fosfórico); carbonildiimidazol; cloruro de p-toluenosulfonilo; y similares], y si es necesario en un disolvente (amidas tales como, por ejemplo, N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), acetamida, N-metilpirrolidona; nitrilos tales como, por ejemplo, acetonitrilo, propionitrilo, n-butironitrilo; alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol, 1,4-butanodiol; éteres tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, anisol, monoetil éter de etilenglicol; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido) a de 0 a 150ºC (preferiblemente de 40 a 120ºC) durante de 0,1 a 24 horas (preferiblemente de 0,5 a 12 horas, y más preferiblemente de 1 a 8 horas), para obtener el compuesto II' deseado representado por la fórmula general [1'].

A continuación se explicará un método para introducir el grupo representado por la fórmula general [101] relevante para la presente invención tomando por ejemplo un caso en el que se sintetiza un compuesto representado por la fórmula general [24] [es decir, un compuesto correspondiente a un caso en el que $R^{1'}$ es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo representado por la fórmula general [101] en la fórmula general [1'] (un grupo correspondiente al caso en el que R^{104} es un átomo de hidrógeno)], entre los compuestos representados por la fórmula general [1']:



(en el que T_{12} representa un grupo alquileno, A representa un tetrafluoroborato o un hexafluorofosfato, y de $R^{3'}$ a $R^{11'}$, $R^{12'}$, de R^{101} a R^{103}, A, m y n son los mismos que anteriormente).

Debe observarse que el compuesto representado por la fórmula general [22] corresponde a un compuesto en el que $R^{1'}$ es un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [2] (es decir, un grupo correspondiente al grupo $-T_{12}-COOR^{12}$), entre los compuestos representados por la fórmula general [1'].

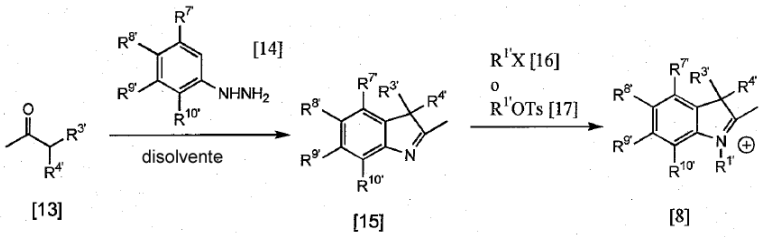
En las fórmulas generales de [22] a [24], el grupo alquileno representado por T_{12} puede ser cualquiera de uno de cadena lineal o ramificado, y preferiblemente uno de cadena lineal de habitualmente C_1 a C_6, y preferiblemente de C_1 a C_4. Específicamente, el grupo incluye un grupo alquileno de cadena lineal tal como, por ejemplo, un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo trimetileno, un grupo tetrametileno, un grupo pentametileno, un grupo hexametileno; un grupo alquileno ramificado tal como un grupo etilideno, un grupo propilideno, un grupo isopropilideno, un grupo etiletileno, un grupo 1,2-dimetiletileno, un grupo 1,2-dietiletileno, un grupo 1,2-di-n-propiletileno, un grupo 1,2-di-n-butiletileno; y similares, y entre ellos, es preferible un grupo alquileno de cadena lineal, en particular, son más preferibles un grupo etileno, un grupo pentametileno y similares.

Es decir, se hace reaccionar un compuesto representado por la fórmula general [22] con un reactivo de succinimidación tal como, por ejemplo, un compuesto representado por la fórmula general [62] (de 1 a 10 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [22]) en presencia de un catalizador básico (aminas orgánicas tales como, por ejemplo, N-etildiisopropilamina, piridina, trietilamina, N,N-dimetilanilina, piperidina, 4-dimetilaminopiridina, 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno, 1,8-diazabicilo[5.4.0]undec-7-eno, tri-n-butilamina) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona) a de 0 a 40ºC durante de 0,1 a 12 horas, para obtener el compuesto representado por la fórmula general [23].

Posteriormente, se hace reaccionar el compuesto representado por la fórmula general [23] con un reactivo de cationización, por ejemplo, representado por la fórmula general [102] (de 1 a 5 veces en cantidad molar con respecto al compuesto representado por la fórmula general [23]) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona) a de 0 a 40ºC durante de 0,1 a 12 horas, para obtener el compuesto representado por la fórmula general [24].

El reactivo de succinimidación relevante para la presente invención incluye no sólo el compuesto representado por la fórmula general [62] descrita anteriormente sino también todas los usados habitualmente en este campo, e incluye específicamente, por ejemplo, carbonato de di(N-succinimidilo) (DSC), tetrafluoroborato de 2-succinimida-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norbomen-2,3-dicarboxiimida)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU) y similares. Además, cuando se lleva a cabo la reacción de succinimidación, la reacción puede llevarse a cabo en presencia de un catalizador básico apropiado (aminas orgánicas tales como, por ejemplo, trietilamina, N-etildiisopropilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, piperidina, 4-dimetilaminopiridina, 1,5-diazabiciclo[4.3.0]non-5-eno, 1,8-diazabicilo[5.4.0]undec-7-eno, tri-n-butilamina).

A continuación se explicará un método para sintetizar el compuesto representado por la fórmula general [8] (una parte de estructura de indolenina):



(en el que, X representa un átomo de halógeno, $R^{1'}$, $R^{3'}$, $R^{4'}$ y de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ son los mismos que anteriormente).

En la fórmula general [16], el átomo de halógeno representado por X incluye, por ejemplo, un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, un átomo de yodo.

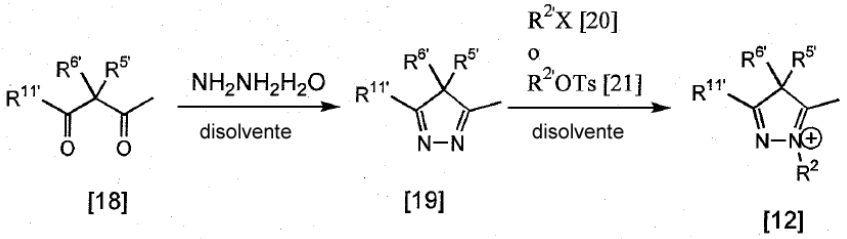
Es decir, se hacen reaccionar un compuesto de cetona representado por la fórmula general [13] y un compuesto representado por la fórmula general [14] en un disolvente apropiado (ácidos carboxílicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico; alcoholes tales como, por ejemplo, etilenglicol, 1,4-butanodiol) a de 40 a 250ºC durante de 0,1 a 24 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [21] (véase, por ejemplo, Journal of Organic Chemistry, 42(14), 2474-80, 1977, etc.).

Posteriormente, se disuelven un compuesto representado por la fórmula general [15] junto con un haluro representado por la fórmula general [16] o un compuesto de tosilato representado por la fórmula general [17] en un disolvente apropiado (hidrocarburos aromáticos halogenados tales como, por ejemplo, clorobenceno, 1,2-diclorobenceno; hidrocarburos halogenados tales como, por ejemplo, 1,2-dicloroetano; hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, tolueno, xileno, benceno; amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; y similares), y se hace reaccionar la mezcla a de 40 a 200ºC durante de 1 a 24 horas, para obtener un compuesto representado por la fórmula general [8] (véase, por ejemplo, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 947-952, 1984, etc.).

El compuesto de cetona representado por la fórmula general [13], puede usar un producto comercial (por ejemplo, 3-metil-2-butanona, 3-metil-2-pentanona, 3-metil-2-hexanona, 1-ciclopropiletanona, 1-ciclobutiletanona y similares), o uno sintetizado según sea apropiado mediante un método habitual. Un ejemplo de síntesis de dicho compuesto de cetona incluye, por ejemplo, un método en el que se hace reaccionar 2-metilacetoacetato de etilo con un compuesto que tiene un grupo saliente (por ejemplo, un átomo de halógeno, un grupo tosilato y similares) en presencia de un catalizador básico (hidruros de metales tales como, por ejemplo, hidruro de sodio, hidruro de potasio; carbonato de metal alcalino tal como, por ejemplo, carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio; alcóxidos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, metóxido de sodio, etóxido de sodio, terc-butóxido de potasio; compuestos básicos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, n-butil-litio; amidas de metales alcalinos tales como, por ejemplo, diisopropilamida de litio) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol; éteres tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, monoetil éter de etilenglicol; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido) a de -80 a 100ºC durante de 0,1 a 24 horas, posteriormente se somete la disolución resultante a descarboxilación usando un catalizador ácido (véase, por ejemplo, Modern Synthetic Reactions, California, 2ª ed., págs. 492, 510 y 756 (1972), etc.) y similares.

El compuesto representado por la fórmula general [14] puede usar un producto comercial o uno sintetizado según sea apropiado mediante un método habitual.

A continuación se explicará un método para sintetizar el compuesto representado por la fórmula general [12] (una parte de estructura de pirazol):



(en el que $R^{2'}$, de $R^{5'}$ a $R^{6'}$, $R^{11'}$ y X son los mismos que anteriormente).

Es decir, se someten el compuesto de dicetona representado por la fórmula general [18] e hidrazina a reacción de deshidratación en un disolvente apropiado (alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol) a de 60 a 100ºC durante de 1 a 4 horas, para obtener un compuesto de 4H-pirazol representado por la fórmula general [19] (véase, por ejemplo, Adv. Heterocycle. Chem. Vol. 34, 53-78, 1983, etc.).

Posteriormente, se someten el compuesto de 4H-pirazol representado por la fórmula general [19] y un haluro representado por la fórmula general [20] o un compuesto de tosilato representado por la fórmula general [21] a reacción de N-alquilación en un disolvente apropiado (hidrocarburos aromáticos halogenados tales como, por ejemplo, clorobenceno, 1,2-diclorobenceno; hidrocarburos halogenados tales como, por ejemplo, 1,2-dicloroetano; hidrocarburos aromáticos tales como, por ejemplo, tolueno, xileno, benceno; amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; y similares) a de 80 a 140ºC durante de 1 a 12 horas, para obtener el compuesto representado por la fórmula general [12] (véase, por ejemplo, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 947-952, 1984, etc.).

El compuesto de dicetona representado por la fórmula general [18] puede usar un producto comercial (por ejemplo, 3,3-dimetil-2,4-pentano-diona y similares), o uno sintetizado según sea apropiado mediante un método habitual. Un ejemplo de la síntesis de dicho compuesto de cetona incluye, por ejemplo, un método en el que se hace reaccionar 3-metil-2,4-pentanodiona o 4-acetil-5-oxohexanoato de etilo con un compuesto que tiene un grupo saliente (por ejemplo, un átomo de halógeno, un grupo tosilato y similares) en presencia de un catalizador básico (hidruros de metales tales como, por ejemplo, hidruro de sodio, hidruro de potasio; carbonatos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, carbonato de litio, carbonato de sodio, carbonato de potasio; alcóxidos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, metóxido de sodio, etóxido de sodio, terc-butóxido de potasio; compuestos básicos de metales alcalinos tales como, por ejemplo, n-butil-litio; amidas de metales alcalinos tales como, por ejemplo, diisopropilamida de litio; y similares) en un disolvente apropiado (amidas tales como, por ejemplo, DMF, DMA, acetamida, N-metilpirrolidona; alcoholes tales como, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, etilenglicol; éteres tales como, por ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, monoetil éter de etilenglicol y similares; sulfóxidos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido; y similares) a de -80 a 100ºC durante de 0,1 a 24 horas (véase, por ejemplo, Modern Synthetic Reactions, California, 2ª ed., págs. 492, 510, 756 (1972), etc.) y similares.

[El compuesto III que tiene 3 o más grupos catiónicos en una molécula relevante para la presente invención (abreviado algunas veces, a continuación en el presente documento, como compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención)]

El compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención es un compuesto que tiene en una molécula habitualmente de 3 a 10 grupos catiónicos, preferiblemente de 5 a 8 grupos catiónicos, y más preferiblemente de 5 a 6 grupos catiónicos. Dado que el compuesto tal como se describió anteriormente tiene una velocidad de migración más rápida cuando se hace migrar electroforéticamente en un sentido desde el lado positivo hacia el lado negativo, un pico del compuesto se detecta en un momento anterior con respecto al de cualquier analito, y por tanto el compuesto puede usarse como sustancia de patrón interno útil. El grupo catiónico descrito anteriormente incluye ion de amonio tal como, por ejemplo, un ion dimetilamonio, un ion dietilamonio, un ion trimetilamonio y similares; y similares.

[El compuesto IV en el que de 1 a 3 grupos de grupos catiónicos del compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención se han sustituido por grupos aniónicos (algunas veces abreviado, a continuación en el presente documento, como compuesto IV con grupos aniónicos introducidos relevante para la presente invención)]

El compuesto IV con grupos aniónicos introducidos relevante para la presente invención es un compuesto que tiene la misma estructura principal que la del compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención en el que de 1 a 3 grupos de los grupos catiónicos se han sustituido por grupos aniónicos. Debido a esta estructura, cuando se hace migrar electroforéticamente este compuesto IV en un sentido desde el lado positivo hacia el lado negativo, se vuelve posible retardar el tiempo de migración de este compuesto IV con respecto al del compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención. Es decir, sustituyendo de 1 a 3 grupos catiónicos por grupos aniónicos dependiendo del tiempo de migración del analito, cuando se usan el compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención y el compuesto IV con grupos aniónicos introducidos relevante para la presente invención en combinación como sustancias de patrón interno, se vuelve posible que se permita situar un pico del analito entre picos de las dos sustancias de patrón interno.

[Método de medición de la presente invención]

El método de medición de la presente invención es un método en el que se usan (1) una combinación del compuesto I que contiene grupos aniónicos y el compuesto II que contiene grupos catiónicos, ambos relevantes para la presente invención, y (2) una combinación del compuesto III que contiene grupos catiónicos y el compuesto IV con grupos aniónicos introducidos, ambos relevantes para la presente invención, como sustancias de patrón interno tal

como se describió anteriormente (a continuación en el presente documento, algunas veces las combinaciones de los compuestos descritos anteriormente se abrevian de manera colectiva como sustancia de patrón interno relevante para la presente invención), y preferiblemente se usa una combinación del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención y el compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención. Debe observarse que cuando se usan las combinaciones descritas anteriormente como sustancias de patrón interno, pueden añadirse adicionalmente una o más clases de sustancias de patrón interno a las combinaciones descritas anteriormente. Es decir, por ejemplo, una combinación de una clase del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención y dos clases del compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención, una combinación de dos clases del compuesto I que contiene grupos aniónicos relevante para la presente invención y una clase del compuesto II con grupos catiónicos introducidos relevante para la presente invención, una combinación de dos clases del compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención y una clase del compuesto IV con grupos aniónicos introducidos relevante para la presente invención, una combinación de una clase del compuesto III que contiene grupos catiónicos relevante para la presente invención y dos clases del compuesto IV con grupos aniónicos introducidos relevante para la presente invención, o similares pueden usarse como sustancias de patrón interno.

El analito relevante para el método de medición de la presente invención no está particularmente limitado, sino que incluye todas las sustancias que se miden en este campo. Específicamente, el analito incluye, por ejemplo, cadena peptídica (por ejemplo, péptido C, angiotensina I y similares), proteína [proteína sérica tal como, por ejemplo, inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina E (IgE), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), B2-microglobulina, albúmina, producto de degradación de las mismas, ferritina; proteína enzimática tal como, por ejemplo, amilasa, fosfatasa alcalina, γ-glutamiltransferasa; proteína, péptido o cadena de azúcar derivada de bacterias tal como, por ejemplo, bacteria de tuberculosis, neumococos, bacilo de la difteria, meningococos, gonococos, estafilococos, estreptococos, bacteria intestinal, bacteria *coli*, *Helicobacter pylori*; virus tales como, por ejemplo, virus de la rubeola, virus del herpes, virus de la hepatitis, virus de la ATL, virus del sida, virus influenza, adenovirus, enterovirus, poliovirus, virus de EB, VHA, VHB, VHC, VIH, HTLV; hongos tales como, por ejemplo, cándida, criptococos; espiroquetas tales como *Leptospira*, *Treponema pallidum*; microorganismos tales como clamidia, micoplasma; varias clases de alérgenos que provocan alergias tales como asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica tales como alérgenos derivados, por ejemplo, de polvo doméstico; ácaros tales como, por ejemplo, dermatofagoides y harina, *Dermatophagoides pteronyssinus*; polen de, por ejemplo, cedro japonés, ciprés japonés, *Paspalum thunbergii* de Kunth, artemisa, anea, grama de olor, centeno; animales tales como, por ejemplo, gato, perro, cangrejo; alimentos tales como, por ejemplo, arroz, clara de huevo; hongos, insectos, madera, agente medicinal, sustancia química y similares; lípido tal como, por ejemplo, lipoproteína; proteasa tal como, por ejemplo, tripsina, plasmina, serina proteasa; proteína marcadora tumoral tal como, por ejemplo, AFP, PSA, CEA, PG I, PG II; y similares], cadena de azúcar (cadena de azúcar de antígeno de cadena de azúcar de marcador tumoral tal como, por ejemplo, CA 19-9, PIVKA-II, CA 125, cadena de azúcar presentada por una sustancia que tiene una cadena de azúcar particular producida por célula cancerosa; por ejemplo, cadena de azúcar de ABO y similares), lectina (por ejemplo, concanavalina A, lectina de lentejas, lectina de judías blancas, lectina de trompetas de ángel, lectina de germen de trigo y similares), fosfolípido (por ejemplo, cardiolipina y similares), lipopolisacárido (por ejemplo, endotoxina y similares), sustancia química (hormona tal como, por ejemplo, PTH, T3, T4, TSH, insulina, LH, FSH, prolactina; disruptores endocrinos tales como, por ejemplo, tributilestaño, nonilfenol, 4-octilfenol, ftalato de di-n-butilo, ftalato de diciclohexilo, benzofenona, octacloroestireno, ftalato de di-2-etilhexilo), receptor (por ejemplo, receptor para estrógenos, TSH y similares), ligando (por ejemplo, estrógeno, TSH y similares), y entre ellos, son preferibles proteína de marcador tumoral tal como, por ejemplo, AFP, PSA, CEA, PG I, PG II, y cadena de azúcar de antígeno de cadena de azúcar de marcador tumoral tal como, por ejemplo, CA 19-9, PIVKA-II, CA 125, cadena de azúcar presentada por una sustancia que tiene una cadena de azúcar particular producida por célula cancerosa, y son particularmente preferibles AFP y PIVKA-II.

El método de electroforesis capilar relevante para la presente invención incluye todos los métodos habitualmente usados en este campo, y entre ellos, es preferible un método de electroforesis llevado a cabo en un chip capilar. El método de electroforesis en (micro)chip capilar es una tecnología en la que se forma un capilar que tiene una sección transversal de 100 μm o menos de diámetro sobre un sustrato de un chip y se lleva a cabo electroforesis en el capilar, y un método mediante el cual sustancias presentes en una muestra se separan usando una diferencia de carga como diferencia de movilidad aplicando tensión eléctrica al interior del capilar.

El método de electroforesis capilar puede clasificarse en método de electroforesis en zona capilar y método de electroforesis en gel capilar dependiendo de la disolución de migración que va a usarse, y el método de la presente invención puede aplicarse a ambos de ellos. Entre los métodos anteriores, es preferible el método de electroforesis en gel en vista de la precisión de separación.

El material del capilar que va a usarse para el método de electroforesis capilar descrito anteriormente no está particularmente limitado, y puede usarse cualquier material comúnmente usado en este campo. Específicamente, el material incluye, por ejemplo, compuesto basado en sílice tal como, por ejemplo, vidrio, cuarzo, silicio; polímero sintético tal como, por ejemplo, copolímero de olefina cíclica (COC), polímero de olefina cíclica (COP), poli(metacrilato de metilo), polimetilsiloxano, poli(cloruro de vinilo), poliuretano, poliestireno, polisulfona, policarbonato, politetrafluoroetileno; y similares, y entre ellos, es preferible el polímero sintético. Además, el diámetro

interno y la longitud del capilar no están particularmente limitados siempre que pueda separarse un analito, pero el diámetro interno es habitualmente de 1 a 1000 μm, preferiblemente de 1 a 200 μm, y más preferiblemente de 1 a 100 μm. La longitud es habitualmente de 0,1 mm a 100 cm, preferiblemente de 0,1 mm a 20 cm, y más preferiblemente de 0,1 mm a 10 cm.

La disolución de migración que va a usarse en el método de electroforesis capilar relevante para la presente invención no está particularmente limitada, y puede usarse cualquier disolución comúnmente usada en este campo. En el caso del método de electroforesis en zona capilar, específicamente la disolución de migración incluye, por ejemplo, una disolución tampón de pH 5 a 10, preferiblemente de pH 6 a 8, y la disolución tampón puede incluir específicamente, pero sin limitarse a, por ejemplo, un tampón de lactato, un tampón de citrato, un tampón de acetato, un tampón de succinato, una disolución tampón de glicina, un tampón de ftalato, un tampón de fosfato, un tampón de trietanolamina, un tampón de barbiturato, una disolución tampón de cloruro de tris(hidroximetil)aminometano, una disolución tampón de tartrato, una disolución tampón de borato y similares. Además, en el caso del método de electroforesis en gel capilar, la disolución de migración incluye aquella en la que se añade un polímero, por ejemplo, poliéter tal como, por ejemplo, poli(óxido de etileno) (polietilenglicol), poli(óxido de propileno); polialquilenimina tal como, por ejemplo, polietilenimina; polímero basado en poli(ácido acrílico) tal como, por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(éster de acrilato), poli(metacrilato de metilo); polímero basado en poliamida tal como, por ejemplo, poliacrilamida, polimetacrilamida; polímero basado en poli(ácido metacrílico) tal como, por ejemplo, poli(ácido metacrílico), poli(éster de metacrilato), poli(metacrilato de metilo); polímero basado en polivinilo tal como, por ejemplo, poli(acetato de vinilo), polivinilpirrolidona, poliviniloxazolidona; polímero de hidroxilo soluble en agua tal como, por ejemplo, pululano, elusinano, goma xantana, dextrano, goma guar; compuesto de celulosa soluble en agua tal como, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y similares; derivados de los mismos; copolímeros que contienen varias clases de unidades monoméricas que constituyen estos polímeros; y similares a las disoluciones tampón que van a usarse como disolución de migración para la electroforesis en zona capilar descrita anteriormente. Debe observarse que los polímeros descritos anteriormente pueden añadirse en una combinación de dos o más clases. Además, el peso molecular de los polímeros descritos anteriormente, tal como se mencionó anteriormente, es habitualmente de 500 Da a 6000 kDa, preferiblemente de 1 a 1000 kDa, y más preferiblemente de 100 a 1000 kDa. Además, la concentración de los polímeros descritos anteriormente puede seleccionarse apropiadamente a partir de un intervalo usado habitualmente en este campo, y es habitualmente del 0,01 al 40% (P/V), preferiblemente del 0,01 al 20% (P/V), y más preferiblemente del 0,1 al 10% (P/V). Debe observarse que la viscosidad de la disolución tampón para la migración cuando se añade la carga descrita anteriormente a la disolución tampón para la migración es habitualmente de 1 a 50 centipoise, preferiblemente de 1 a 20 centipoise, y más preferiblemente de 1 a 10 centipoise.

La disolución de migración descrita anteriormente puede contener una sustancia para reducir un efecto de flujo electroosmótico tal como, por ejemplo, poliacrilamida, polietilenglicol, polietilenimina, hidrocarburo aromático que contiene flúor, azúcares y similares, y la concentración de la misma puede fijarse en un intervalo que va a usarse habitualmente en este campo.

Dado que la tensión en la migración en el método de electroforesis capilar relevante para la presente invención varía dependiendo de la disolución de migración, el equipo que va a usarse o similares, la tensión puede fijarse apropiadamente en un intervalo que va a usarse habitualmente en este campo.

El método para introducir una muestra en el método de electroforesis capilar relevante para la presente invención o una sustancia de patrón interno relevante para la presente invención no está particularmente limitado, y puede ser un método habitualmente usado en este campo. El método incluye, por ejemplo, un método de aspiración, método de presurización, método de introducción eléctrica y similares. Entre ellos, es preferible el método de presurización. Debe observarse que la sustancia de patrón interno relevante para la presente invención puede introducirse mediante o bien un método en el que la sustancia de patrón interno se disuelve en una muestra por adelantado o bien un método en el que se introducen por separado una muestra y una disolución que contiene la sustancia de patrón interno. La cantidad de la sustancia de patrón interno que va a introducirse varía dependiendo de condiciones tales como el diámetro interno y la longitud del capilar, el tipo y la sensibilidad del detector, pero habitualmente se usa la misma cantidad que la de una muestra que va a introducirse. Habitualmente se introducen de 0,001 a 100 fmol en el capilar. Debe observarse que la introducción de la muestra descrita anteriormente o la sustancia de patrón interno relevante para la presente invención puede llevarse a cabo concentrando mediante una isotacoforesis (ITP) conocida y posteriormente introduciendo el concentrado en el capilar de electroforesis tal cual. En este caso, por ejemplo, cuando se usa electroforesis en microchip, es deseable llevar a cabo la electroforesis de ITP y la electroforesis capilar de manera continua usando un chip en el que la electroforesis de ITP y la electroforesis capilar están conectadas entre sí.

La muestra que va a usarse en el método de electroforesis capilar descrito anteriormente no está particularmente limitada, y puede ser una disolución que contiene el analito descrito anteriormente. Específicamente, la muestra puede ser una disolución que contiene el analito descrito anteriormente. Específicamente, la muestra incluye, por ejemplo, líquido corporal tal como suero, plasma, líquido espinal, líquido sinovial, líquido linfático; excremento tal como orina y heces; muestra derivada de organismo vivo tal como esputo, pus, sustancia derivada de la piel; muestra medioambiental tal como, por ejemplo, alimentos, bebida, agua corriente, agua del mar, agua de lago, agua

de rio, efluente de fábrica, agua de lavado para semiconductor, agua de limpieza tras limpiar dispositivos médicos y similares; y líquido procesado obtenido mediante reconstitución disolviendo apropiadamente estas sustancias en agua, una disolución tampón que va a usarse habitualmente en este campo tal como, por ejemplo, un tampón de Tris, un tampón de fosfato, un tampón de veronal, un tampón de borato, un tampón de Good; y similares.

El método de electroforesis capilar en el método de medición de la presente invención se realiza llenando la disolución de migración descrita anteriormente en el capilar descrito anteriormente, introduciendo posteriormente la muestra descrita anteriormente y las sustancias de patrón interno relevantes para la presente invención en el capilar mediante el método de introducción descrito anteriormente, llevando a cabo una electroforesis mediante aplicación de una tensión usada habitualmente en este campo, y midiendo mediante detectores tales como detector de fluorescencia, detector de UV o similares. Más específicamente, el método se realiza llenando, por ejemplo, un tampón de Tris-HCl que contiene del 0,1 al 1,0% de polidimetilacrilamida, del 1 al 5% de glicerol, y del 0,01 al 0,1% de BSA en un capilar, por ejemplo, que tiene un diámetro interno de 50 a 100 μm y una longitud de 1 a 10 cm, introduciendo una muestra que contiene una clase de sustancia de patrón interno en un capilar desde el extremo de partida del mismo mediante el método de presurización a de 1 a 10 psi durante de 30 a 60 segundos, introduciendo posteriormente otra sustancia de patrón interno en un capilar mediante el método de presurización a de 1 a 10 psi durante de 30 a 60 segundos, después de eso llevando a cabo una electroforesis mediante aplicación, por ejemplo, de una tensión de 1000 a 3000 V durante de 10 a 60 minutos, y midiendo mediante un detector de fluorescencia.

En el método de medición de la presente invención, la electroforesis capilar se realiza llevando a cabo una electroforesis en condiciones tales como se mencionaron anteriormente, y midiendo estados de migración de un analito y las sustancias de patrón interno usando un detector tal como detector de fluorescencia, detector de UV, para obtener un electroferograma, identificando picos de las sustancias de patrón interno en dicho electroferograma, después de eso identificando un pico de un analito a partir del tiempo de migración del mismo y similares.

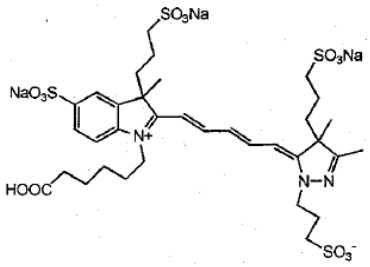
Más específicamente, por ejemplo, cuando se mide un analito en una muestra usando dos sustancias de patrón interno, se lleva a cabo electroforesis para las sustancias de patrón interno y una sustancia de patrón del analito por adelantado, y se miden los tiempos de migración de las dos sustancias de patrón interno y del analito, la razón de los tiempos de migración entre muestras de patrones internos respectivos, y las razones de tiempos de migración entre las sustancias de patrón interno y el analito. Posteriormente, se lleva a cabo la electroforesis de la muestra y el analito en las mismas condiciones, y se identifican picos de las dos sustancias de patrón interno a partir de sus tiempos de migración y las razones de tiempos de migración entre sustancias de patrón interno respectivas obtenidas por adelantado. Finalmente, se identifica el pico del analito a partir de los tiempos de migración de dichas dos sustancias de patrón interno y razones de tiempos de migración entre sustancias de patrón interno respectivas y el analito obtenidas por adelantado.

A continuación en el presente documento se describirán ejemplos experimentales y ejemplos de la presente invención, sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos.

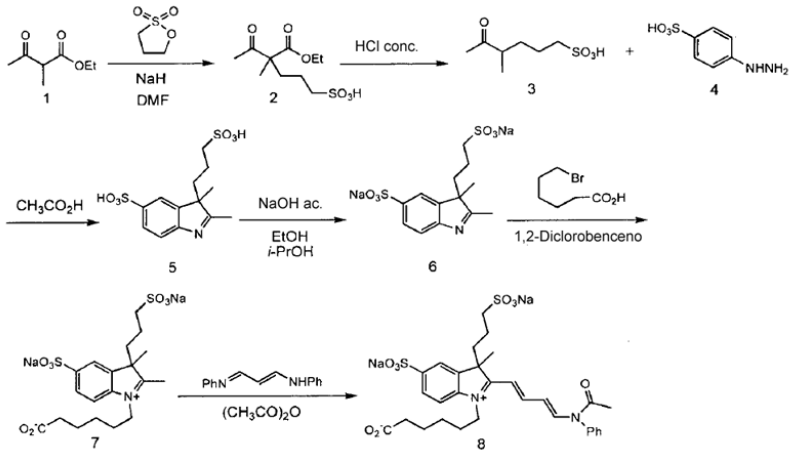
Ejemplos

Ejemplo experimental 1. Síntesis de sustancia de patrón interno relevante para la presente invención 1

Se sintetizó la siguiente sustancia de patrón interno relevante para la presente invención 1.



(1) En primer lugar, se sintetizó compuesto de indolenina 8 de la siguiente manera.



* Et = grupo etilo, Ph = grupo fenilo

A continuación se explican detalles.

[Síntesis del compuesto 2]

Se añadieron 2-metilacetoacetato de etilo (1) (25,0 g, 0,173 mol), 1,3-propanosultona (23,3 g, 0,190 mol) e hidruro de sodio (8,5 g, 0,208 mol) a N,N-dimetilformamida (DMF) (80 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 90ºC durante la noche. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se lavó la mezcla residual dos veces mediante adición de agua (200 ml) y dietil éter (200 ml). Después de eso, se eliminó la parte de fase acuosa mediante destilación a presión reducida para obtener compuesto 2 (42,1 g, rendimiento: 91%).

[Síntesis del compuesto 3]

Se hizo reaccionar compuesto 2 (40,5 g, 0,152 mol) en ácido clorhídrico concentrado (60 ml) con agitación a 100ºC durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando cromatografía en columna de gel de sílice (eluato: metanol) para obtener compuesto 3 (16,6 g, rendimiento: 56%).

[Síntesis del compuesto 5]

Se calentaron compuesto 3 (10,0 g, 0,051 mol) y compuesto 4 (12,9 g, 0,066 mol) en ácido acético (50 ml) a reflujo a 120ºC durante 4 horas. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: agua) para obtener compuesto 5 (11,5 g, rendimiento: 65%).

Datos de propiedades: IR (KBr) (cm^{-1}): 3450, 1196

[Síntesis del compuesto 6]

Se disolvió compuesto 5 (11,5 g, 0,033 mol) en agua (50 ml) y etanol (50 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Tras completarse la reacción, se eliminaron los disolventes mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: agua) para obtener compuesto 6 (10,3 g, rendimiento: 80%).

Datos de propiedades: Masa (nega. = 346)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3444, 1193

[Síntesis del compuesto 7]

Se disolvieron compuesto 6 (10,0 g, 0,026 mol) y ácido 6-bromohexanoico (9,97 g, 0,052 mol) en 1,2-diclorobenceno (100 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 120ºC durante la noche. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se lavó la mezcla residual con acetato de etilo 3 veces para obtener compuesto 7 (11,5 g, rendimiento: 89%).

Datos de propiedades: Masa (nega. = 460)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3446, 1723, 1194

[Síntesis del compuesto 8]

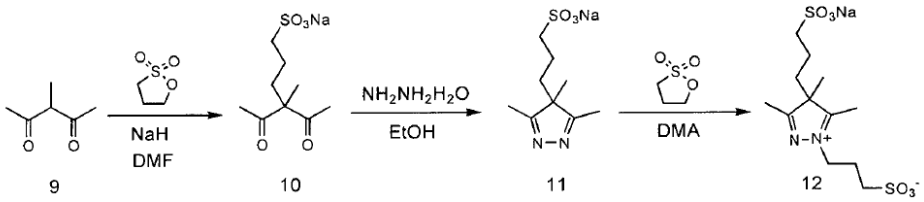
Se disolvieron compuesto 7 (1,5 g, 2,967 mmol) y clorhidrato de malonaldehído-anilina (0,77 g, 2,967 mmol) en anhídrido acético (20 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 120ºC durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: disolución acuosa al 10% de acetonitrilo) para obtener compuesto de indolenina 8 (0,18 g, rendimiento: 10%).

Datos de propiedades: Masa (nega. : posi. = 631 : 633)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3443, 1716, 1574, 1465, 1189

(2) Síntesis de compuesto de pirazol 12

Posteriormente, se sintetizó el compuesto de pirazol 12 tal como se describe a continuación.



*DMA = dimetilacetamida

A continuación se explican detalles.

[Síntesis del compuesto 10]

En DMF (100 ml), se hicieron reaccionar 3-metil-2,4-pentanodiona (compuesto 9) (15,0 g, 0,13 mol), 1,3-propanosultona (16,1 g, 0,13 mol) e hidruro de sodio (5,0 g, 0,208 mol) con agitación a 50ºC durante 16 horas. Tras completarse la reacción, se neutralizó la disolución con hidróxido de sodio 1 N, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se lavó la mezcla residual dos veces mediante adición de agua (200 ml) y dietil éter (200 ml). Después de eso, se eliminó la parte de fase acuosa mediante destilación a presión reducida para obtener compuesto de pirazol 10 (32,2 g, rendimiento: 96%).

Datos de propiedades: IR (KBr) (cm^{-1}): 3474, 1695, 1665, 1191

[Síntesis del compuesto 11]

Se disolvieron compuesto 10 (10,0 g, 0,042 mol) y monohidrato de hidrazina (2,1 g, 0,042 mol) en etanol (150 ml), y se hizo reaccionar la disolución con agitación a 80ºC durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando cromatografía en columna de gel de sílice (eluato: metanol/cloroformo = 1/1) para obtener compuesto 11 (9,0 g, rendimiento: 92%).

Datos de propiedades: IR (KBr) (cm^{-1}): 3421, 1195

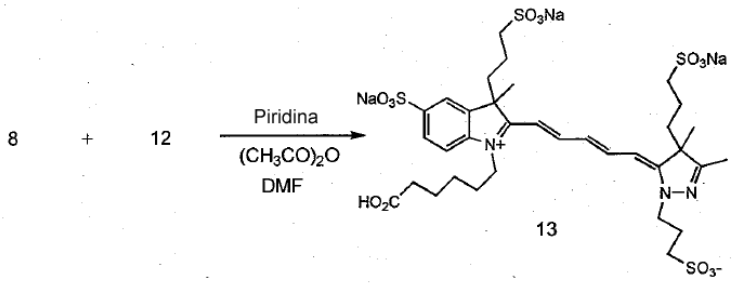
[Síntesis del compuesto 12]

Se disolvieron compuesto 11 (4,8 g, 0,019 mol) y 1,3-propanosultona (2,5 g, 0,02 mol) en dimetilacetamida (30 ml), y se agitó la disolución a 140ºC durante 4 horas. Tras completarse la reacción, se añadió acetato de etilo (200 ml) para depositar un cristal, que se filtró para dar el compuesto de pirazol (12) (5,3 g, rendimiento: 76%).

Datos de propiedades: Masa (nega. = 352)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3446, 1194

(3) Síntesis de complejo de compuesto de indolenina - compuesto de pirazol 13



Se disolvieron compuesto de indolenina 8 (0,1 g, 0,158 mmol) obtenido en el ejemplo 1 - (1) y compuesto de pirazol 12 (0,17 g, 0,474 mmol) obtenido en el ejemplo 1 - (2) en DMF (2 ml), y se añadieron adicionalmente piridina (1 ml) y anhídrido acético (0,5 ml) a los mismos. Se agitó la disolución a 80ºC durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando cromatografía en columna de fase inversa (eluato: disolución acuosa al 10% de metanol) y Sephadex LH-20 [fabricado por GE Healthcare Bioscience Co., Ltd. (nombre anterior: Amersham Bioscience Co. Ltd.)] (eluato: metanol) para obtener compuesto 13 (15 mg, rendimiento: 12%). En los siguientes ejemplos, se usó dicho compuesto 8 como sustancia de patrón interno.

Datos de propiedades: Masa (nega. = 850)

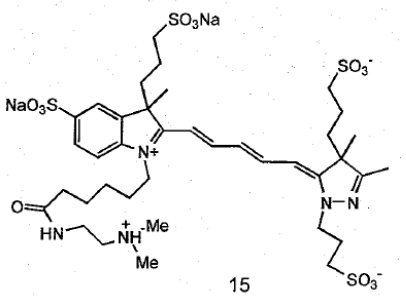
A continuación se muestran las características de fluorescencia del compuesto 13.

[Tabla 1]

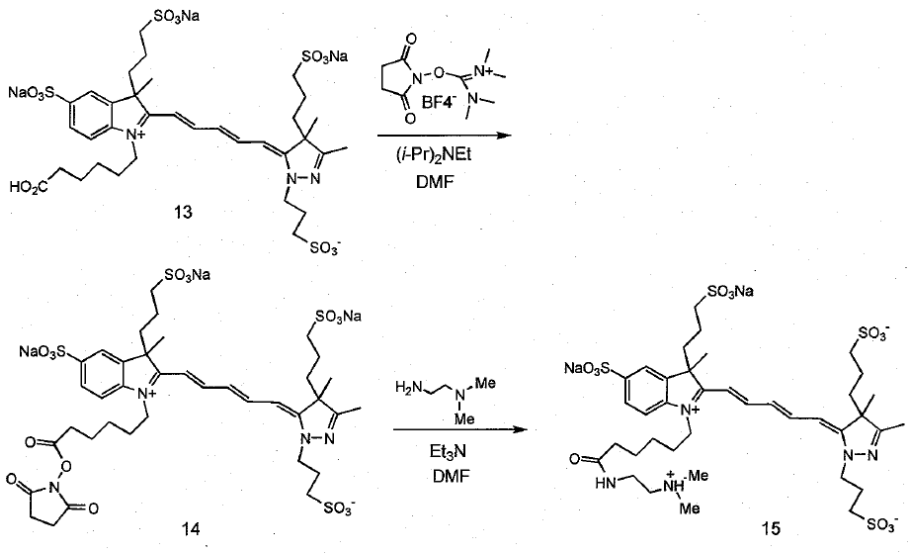
Longitud de onda de absorción máxima (λmáx)	634 nm
Coeficiente de absorción molar (ε)	230.000 $M^{-1}cm^{-1}$
Longitud de onda de excitación máxima [Ex(máx)]	635 nm
Longitud de onda de fluorescencia máxima [Em(máx)]	655 nm

Ejemplo experimental 2. (Método de síntesis para la sustancia de patrón interno con grupos catiónicos introducidos)

Se sintetizó el siguiente compuesto según la siguiente reacción de síntesis. Debe observarse que dicho compuesto 15 se usó como sustancia de patrón interno 2 en el siguiente ejemplo.



*Me = grupo metilo



(1) Síntesis de complejo de compuesto de indolenina - compuesto de pirazol 14

Se disolvió compuesto 13 (13 mg, 0,015 mmol) obtenido mediante (1) en el ejemplo 1 en DMF (0,6 ml), y se añadieron tetrafluoroborato de 2-succinimida-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU) (46 mg) y N-etildiisopropilamina [(i-Pr)$_2$NEt] (600 μl) al mismo. Se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras completarse la reacción, se cristalizó el producto mediante adición de acetato de etilo (15 ml) y se centrifugó para obtener compuesto 14 (13 mg, rendimiento: 90%).

Datos de propiedades: Masa (nega. = 947)

(2) Síntesis de complejo de compuesto de indolenina - compuesto de pirazol 15

Se disolvió el compuesto 14 descrito anteriormente (7 mg) en DMF (0,5 ml), y se añadieron N,N-dimetilaminoetilamina (10 mg) y trietilamina (Et_3N) (2 μl) al mismo. Se agitó la disolución durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se eliminó el disolvente mediante destilación a presión reducida, y se purificó el producto usando columna de fase inversa preparativa para obtener compuesto 15 (3,2 mg). Debe observarse que dicho compuesto 15 se usó como sustancia de patrón interno 2 en los siguientes ejemplos.

Datos de propiedades: Masa (nega. = 933)

A continuación se muestran las características de fluorescencia del compuesto 15.

[Tabla 2]

Longitud de onda de absorción máxima (λmáx)	634 nm
Coeficiente de absorción molar (ε)	230.000 $M^{-1}cm^{-1}$
Longitud de onda de excitación máxima [Ex(máx)]	635 nm
Longitud de onda de fluorescencia máxima [Em(máx)]	655 nm

Ejemplo 1. Separación y medición de AFP

[Analito (antígeno)]

α-fetoproteína (AFP) (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

[Sustancia de unión de cambio de movilidad (anticuerpo marcado con ADN)]

Según el procedimiento mostrado en la figura 1, se preparó un fragmento Fab' de anticuerpo anti-AFP unido a ADN. Es decir, en primer lugar, se purificó un fragmento de ADN de 250 pb con grupo NH_2 introducido en el extremo terminal en 5' mediante un método común (ADN aminado en el extremo terminal purificado), posteriormente se hizo reaccionar el grupo NH_2 introducido en este fragmento de ADN con un grupo de unión succinimida de 4-(p-maleimidafenil)butilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB) (un grupo de unión que tiene un grupo succinimida y un grupo maleimida, fabricado por Pierce Biotechnology, Inc.) mediante un método común, y después se eliminó el grupo de unión sin reaccionar sometiéndolo a tratamiento de filtración en gel, para obtener un fragmento de ADN de

250 pb unido a grupo de unión. Se hizo reaccionar el fragmento de ADN de 250 pb unido a grupo de unión obtenido con fragmento Fab' de anticuerpo WA1 anti-AFP preparado usando anticuerpo WA1 anti-AFP (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) según un método común por adelantado. Se purificó el producto obtenido usando columna de DEAE para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo WA1 anti-AFP al que se le unió un fragmento de ADN de 250 pb (anticuerpo marcado con ADN de 250 pb).

[Sustancia de unión marcada (anticuerpo marcado con fluorescencia)]

Se trató anticuerpo WA2 anti-AFP (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), que reconoce un epítopo de AFP diferente del anticuerpo WA1, mediante un método común para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo WA2 anti-AFP, y después se introdujo una sustancia fluorescente HyLyte 647 (fabricada por AnaSpec, Inc.) en un grupo amino de dicho fragmento mediante un método común, para preparar un fragmento Fab' de anticuerpo WA2 anti-AFP marcado con HyLyte 647 (anticuerpo marcado con fluorescencia).

[Sustancia de patrón interno]

Se usaron las sustancias de patrón interno 1 y 2 obtenidas en los ejemplos experimentales 1 y 2, respectivamente.

[Chip capilar]

Se preparó un chip capilar que tenía una disposición mostrada en la figura 2 tal como se describe a continuación según el método descrito en Technology and applications of micro chemical chip, Takehiko Kitamori, *et al.*, 2004 ed. (Maruzen Co., Ltd.).

Es decir, se preparó una película fotorresistente sobre un Si depositado sobre un sustrato de cuarzo. Se expuso esta película fotorresistente usando una máscara que tenía el diseño capilar (disposición) ilustrado en la figura 2, y después se llevó a cabo el revelado. Se eliminó mediante bombardeo catódico el Si en la parte en la que se eliminó la película fotorresistente mediante revelado, después de eso, se llevó a cabo grabado en húmedo usando disolución de fluoruro de hidrógeno para realizar surcos de canales capilares (capilar) sobre el sustrato de cuarzo. Tras eliminar las películas fotorresistente y de Si que quedaban sobre el sustrato de cuarzo, dicho sustrato de cuarzo y una placa de recubrimiento que tenía orificios (pocillos) como depósitos de líquido se laminaron mediante método de conexión por HF para preparar un chip capilar.

Debe observarse que, en la figura 2, TB representa un pocillo para introducir tampón posterior, LB1 y LB2 representan pocillos para introducir tampón anterior, S representa un pocillo para introducir una muestra de migración, R1 representa un pocillo para introducir disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN de 250 pb), W1, W2 y W3 representan pocillos para el drenado, respectivamente.

[Electroforesis]

(1) Tampón anterior

Se usó un tampón de Tris-HCl 75 mM (pH 7,5) que contenía el 0,6% (p/v) de polidimetilacrilamida (pDMA), el 3% (p/v) de glicerol, 75 mM de NaCl, el 0,01% de albúmina de suero bovino (BSA) y 4 mg/ml de LCA como tampón anterior.

(2) Tampón posterior

Se usó un tampón de Tris 75 mM que contenía el 0,6% (p/v) de pDMA, el 3% (p/v) de glicerol, el 0,01% de BSA y 125 mM de HEPES como tampón posterior.

(3) Muestra para migración

Se usó un tampón de Tris-HCl 75 mM (pH 7,5) que contenía el 0,6% (p/v) de polidimetilacrilamida (pDMA), el 3% (p/v) de glicerol, 75 mM de NaCl, el 0,01% de BSA y 3,6 mM de MES como tampón de muestra, y se mezclaron 1 μl de suero que contenía 100 pM de AFP, 1 μl de anticuerpo marcado con fluorescencia y 1 nM de sustancia de patrón interno 1 y 8 μl del tampón de muestra en un tubo de 0,5 ml, para preparar 10 μl de líquido de reacción.

Se colocó el líquido de reacción sobre hielo para permitir que avanzara una reacción de antígeno - anticuerpo durante aproximadamente 30 minutos, para formar un complejo inmunitario de anticuerpo marcado con fluorescencia - AFP. Debe observarse que la concentración final del anticuerpo marcado con fluorescencia era de 100 nM.

Se usó el líquido de reacción que contenía complejo inmunitario obtenido como muestra para migración.

(4) Disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN de 250 pb)

Se usó un tampón anterior que contenía 100 nM de anticuerpo marcado con ADN de 250 pb y 1 nM de sustancia de patrón interno 2 (que contenía 50 mM de ion Cl^-) como disolución de prueba.

(5) Procedimientos de electroforesis

a) Introducción de la muestra para migración y la disolución de prueba

En la figura 2, se añadieron gota a gota 10 μl de la muestra para migración (disolución que contiene complejo inmunitario de anticuerpo marcado con fluorescencia - AFP) al pocillo S (un pocillo para introducir una muestra para migración), 10 μl de la disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN) al pocillo R1 (un pocillo para introducir una disolución de prueba), 10 μl del tampón anterior al pocillo LB1 y al pocillo LB2, y 10 μl del tampón posterior al pocillo TB, respectivamente. Se introdujeron la muestra para migración, la disolución de prueba, el tampón anterior y el tampón posterior en canales mediante aplicación de una presión de -5 psi entre W1 (un pocillo para drenaje) - W2 (un pocillo para drenaje) - W3 (un pocillo para drenaje) durante 30 segundos. La disposición de la muestra para migración y la disolución de prueba en un capilar se muestra esquemáticamente en la figura 3. Debe observarse que en la figura 3, la parte sombreada representa una parte ocupada por la muestra para migración, y la parte en trazado discontinuo representa una parte ocupada por la disolución de prueba.

b) Detección mediante ITP (reacción, concentración, separación)

Aplicando una tensión de 3000 V entre el pocillo TB y el pocillo LB1 en la figura 3, se puso en contacto el anticuerpo marcado con ADN de 250 pb en la disolución de prueba con el complejo inmunitario de anticuerpo marcado con fluorescencia - AFP en la muestra para migración a 30ºC, para formar un complejo inmunitario de anticuerpo marcado con fluorescencia – AFP - anticuerpo marcado con ADN de 250 pb, que después se concentró mediante isotacoforesis (ITP).

Debe observarse que el tiempo de reacción fue de aproximadamente 100 segundos (como tiempo para que el anticuerpo marcado con ADN de 250 pb pase a través de la zona de la muestra para migración (la zona sombreada)). Tras migrar el complejo inmunitario a LB2 y evaluar su paso a través de LB2 a partir de un cambio en la tensión, se cambió el electrodo negativo de TB a LB2, y se llevó a cabo adicionalmente la electroforesis en gel capilar (CGE) hasta que se detectó un pico del complejo inmunitario de anticuerpo marcado con fluorescencia - AFP - anticuerpo marcado con ADN de 250 pb en la parte de detección (una parte capilar alejada 2 cm de la parte de cruce del canal de LB2).

Debe observarse además que la detección se llevó a cabo a lo largo del tiempo midiendo la intensidad de fluorescencia generada mediante excitación con láser a 635 nm en la parte capilar alejada 2 cm de la parte de cruce del canal de LB2, usando un microscopio de fluorescencia (BX-50, fabricado por KS Olympus Co., Ltd.).

[Resultados]

En la figura 4 se muestra un perfil electroforético (electroferograma) cuando se usó la muestra para migración. Debe observarse que, en la figura 4, el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal representa el tiempo de retención, respectivamente.

A partir de los resultados en la figura 4, se encontró que llevando a cabo la electroforesis usando sustancias de patrón interno 1 y 2 relevantes para la presente invención tal como se mencionó anteriormente, se permitió que los picos de AFP-L1 y AFP-L3 que iban a medirse se ubicaran entre ambos picos de las sustancias de patrón interno, y de ese modo ambos picos podían identificarse fácilmente.

Ejemplo 2. Separación y medición de PNK II

[Analito (antígeno)]

Se preparó PNK II según el método descrito en Poser JW, Price PA, J. Biol. Chem. 25 de enero de 1979; 254(2): 431-6.

[Sustancia de unión de cambio de movilidad (anticuerpo marcado con ADN)]

Se llevó a cabo la preparación de la sustancia de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto porque se usó fragmento Fab' de PNKA II en lugar de fragmento Fab' de anticuerpo WA1 anti-AFP, para obtener un fragmento Fab' de anticuerpo anti-PNKA II (anticuerpo marcado con ADN de 250 pb).

[Sustancia de unión marcada (anticuerpo marcado con fluorescencia)]

Se trató un anticuerpo anti-protrombina preparado mediante un método común para producir un fragmento Fab' de

anticuerpo anti-protrombina, y mediante introducción de una sustancia fluorescente HyLyte 647 (fabricada por AnaSpec, Inc.) mediante un método común a un grupo amino de dicho fragmento, se preparó fragmento Fab' de anticuerpo anti-protrombina marcado con HyLyte 647 (anticuerpo marcado con fluorescencia).

[Sustancia de patrón interno]

Se usaron las sustancias de patrón interno 1 y 2 obtenidas en los ejemplos experimentales 1 y 2, respectivamente.

[Chip capilar]

Se usó el mismo que en el ejemplo 1.

[Electroforesis]

(1) Tampón anterior

Se usó el mismo que en el ejemplo 1.

(2) Tampón posterior

Se usó el mismo que en el ejemplo 1.

(3) Muestra para migración

Se usó un tampón de Tris-HCl 75 mM (pH 7,5) que contenía el 0,6% (p/v) de polidimetilacrilamida (pDMA), el 3% (p/v) de glicerol, 75 mM de NaCl, el 0,01% de BSA y 3,6 mM de MES como tampón de muestra, y se mezclaron 1 μl de suero que contenía 100 pM de PIVKA II, 1 μM de anticuerpo marcado con fluorescencia y 5 μl de 1,4 nM de sustancia de patrón interno 1 y 8 μl del tampón de muestra en un tubo de 0,5 ml, para preparar un líquido de reacción.

Se colocó el líquido de reacción sobre hielo para permitir que avanzara una reacción de antígeno - anticuerpo durante aproximadamente 30 minutos, para formar un complejo inmunitario de anticuerpo marcado con fluorescencia - PIVKA II. Debe observarse que la concentración final del anticuerpo marcado con fluorescencia era de 100 nM.

Se usó el líquido de reacción que contenía complejo inmunitario obtenido como muestra para migración.

(4) Disolución de prueba (disolución que contiene anticuerpo marcado con ADN de 250 pb)

Se usó un tampón anterior que contenía 200 nM de anticuerpo marcado con ADN de 250 pb y 140 pM de sustancia de patrón interno 2 (que contenía 50 mM de ion Cl^-) como disolución de prueba.

(5) Procedimientos de electroforesis

Se introdujeron la muestra para migración y la disolución de prueba de la misma manera que en el ejemplo 1, y tras concentrar mediante ITP y llevar a cabo CGE, se midió a lo largo del tiempo la intensidad de fluorescencia generada mediante excitación por láser a 635 nm en la parte de capilar alejada 2 cm de la parte de cruce de canal de LB2 usando un microscopio de fluorescencia (BX-50, fabricado por Olympus Co., Ltd.).

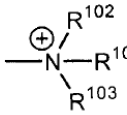
[Resultados]

En la figura 5 se muestra un perfil electroforético (electroferograma) cuando se usó la muestra para migración. Debe observarse que en la figura 5, el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia, y el eje horizontal representa el tiempo de retención, respectivamente.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se encontró que llevando a cabo la electroforesis usando sustancias de patrón interno 1 y 2 relevantes para la presente invención, se permitió que un pico de PIVKA II se situara entre ambos picos de las sustancias de patrón interno, y de ese modo el pico de PIVKA II pudo identificarse fácilmente.

REIVINDICACIONES

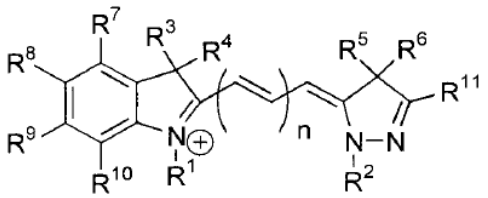
1. Método de medición para detectar un analito mediante un método de electroforesis capilar, caracterizado porque se identifica un pico del analito usando una sustancia de patrón interno que es una combinación de un compuesto I que tiene 3 o más grupos aniónicos representados por $-COO^-$ o $-SO_3^-$ en el compuesto y un compuesto II en el que de 1 a 3 grupos de los grupos aniónicos de dicho compuesto I se han sustituido por grupos catiónicos representados por la siguiente fórmula general [103]:



[103]

(en la que de R^{102} a R^{104} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo de C_1 a C_3, y de 2 a 3 grupos de R^{102} a R^{104} junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un catión de amonio heterocíclico).

2. Método de medición según la reivindicación 1, en el que el compuesto I que tiene 3 o más grupos aniónicos representados por $-COO^-$ o $-SO_3^-$ en el compuesto es un compuesto representado por la fórmula general [1] o una sal del mismo:



[1]

[en la que de R^1 a R^6 representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida;

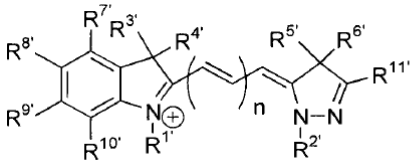
de R^7 a R^{10} representan cada uno independientemente un grupo alquilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo alquilsulfonilo, un grupo arilsulfonilo, un grupo amino sustituido, $-COO^-$, $-SO_3^-$, un átomo de halógeno, un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano o un grupo nitro;

R^{11} representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquinilo o un grupo arilo, y

n representa un número entero de desde 0 hasta 3,

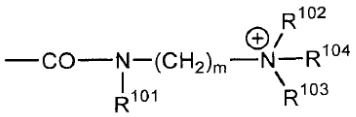
y al menos 3 grupos de R^1 a R^{11} son $-COO^-$ o $–SO_3^-$, o grupos que tienen, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3$];

y el compuesto II en el que de 1 a 3 grupos de los grupos aniónicos se han sustituido por grupos catiónicos representados por la fórmula general [103] es un compuesto II' representado por la fórmula general [1'] o una sal del mismo:



[1']

[en la que de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]:



[101]

(en la que de R^{101} a R^{104} representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo

alquilo de C_1 a C_3; m representa un número entero de desde 2 hasta 6; y de 2 a 3 grupos de R^{102} a R^{104} junto con un átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un catión de amonio heterocíclico), o un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$ o que no está sustituido, que puede tener un enlace amida;

de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo alcoxilo, un grupo ariloxilo, un grupo alquilsulfonilo, un grupo arilsulfonilo, un grupo amino sustituido, $-COO^-$, $-SO_3^-$, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo ciano o un grupo nitro;

$R^{11'}$ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquinilo o un grupo arilo; y

n representa un número entero de desde 0 hasta 3,

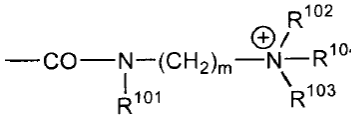
y al menos uno de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ es un grupo alquilo que tiene como sustituyente un grupo representado por la fórmula general [101]].

3. Método de medición según la reivindicación 2, en el que el compuesto I representado por la fórmula general [1] es un compuesto en el que de R^1 a R^6 representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no está sustituido;

de R^7 a R^{10} representan cada uno independientemente $-COO^-$, $-SO_3^-$ o un átomo de hidrógeno;

R^{11} representa un grupo alquilo;

y el compuesto II' representado por la fórmula general [1'] es un compuesto en el que de $R^{1'}$ a $R^{6'}$ representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]:



[101]

(en la que de R^{101} a R^{104} son los mismos que anteriormente), o un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, o que no está sustituido;

de $R^{7'}$ a $R^{10'}$ representan cada uno independientemente $-COO^-$, $-SO_3^-$ o un átomo de hidrógeno;

y $R^{11'}$ representa un grupo alquilo.

4. Método de medición según la reivindicación 3, en el que R^1 y R^2 representan cada uno independientemente un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$; uno cualquiera de R^3 y R^4 representa un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro representa un grupo alquilo no sustituido; uno cualquiera de R^5 y R^6 representa un grupo alquilo que tiene como sustituyente $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro representa un grupo alquilo no sustituido.

5. Método de medición según la reivindicación 3, en el que uno cualquiera de $R^{1'}$ y $R^{2'}$ representa un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro representa un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, un grupo representado por la fórmula general [101]; uno cualquiera de $R^{3'}$ y $R^{4'}$ representa un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro representa un grupo alquilo no sustituido; y uno cualquiera de $R^{5'}$ y $R^{6'}$ representa un grupo alquilo que tiene, como sustituyente, $-COO^-$ o $-SO_3^-$, y el otro representa un grupo alquilo no sustituido.

6. Método de medición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el analito es una α-fetoproteína (AFP) o proteína inducida por ausencia/antagonista de vitamina K II (PIVKA II).

Fig.1

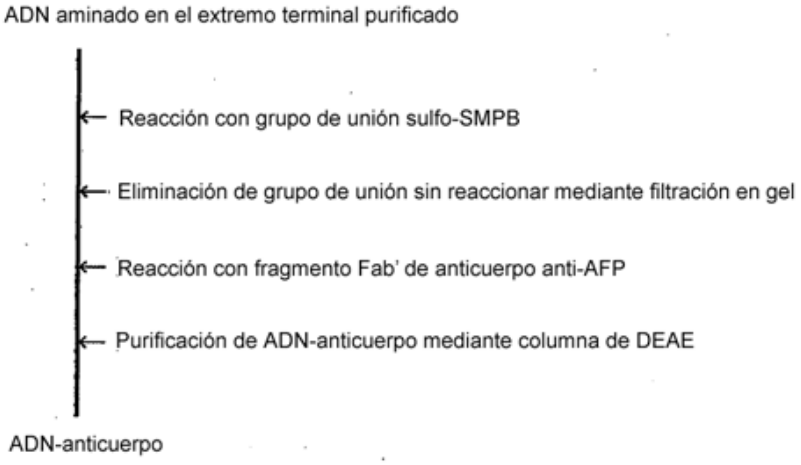


Fig.2

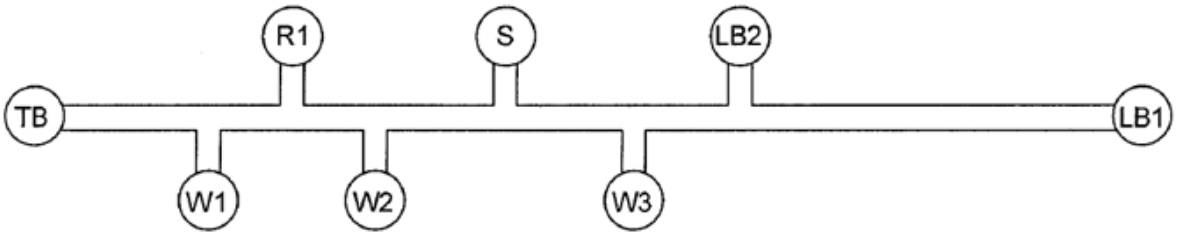


Fig.3

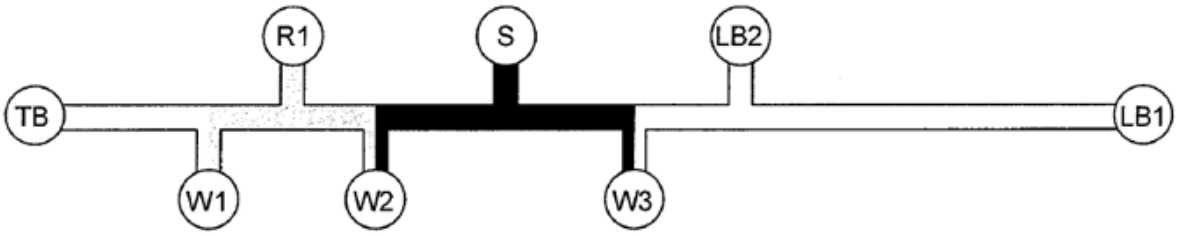


Fig.4

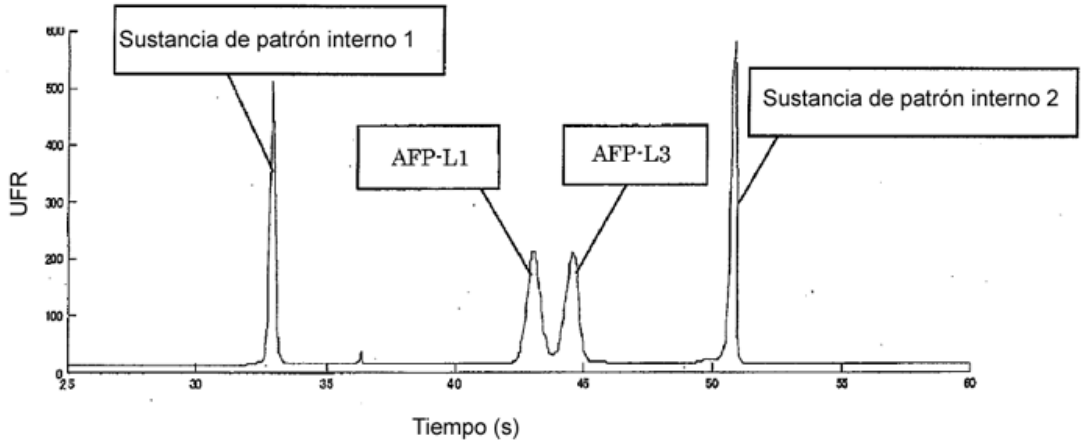
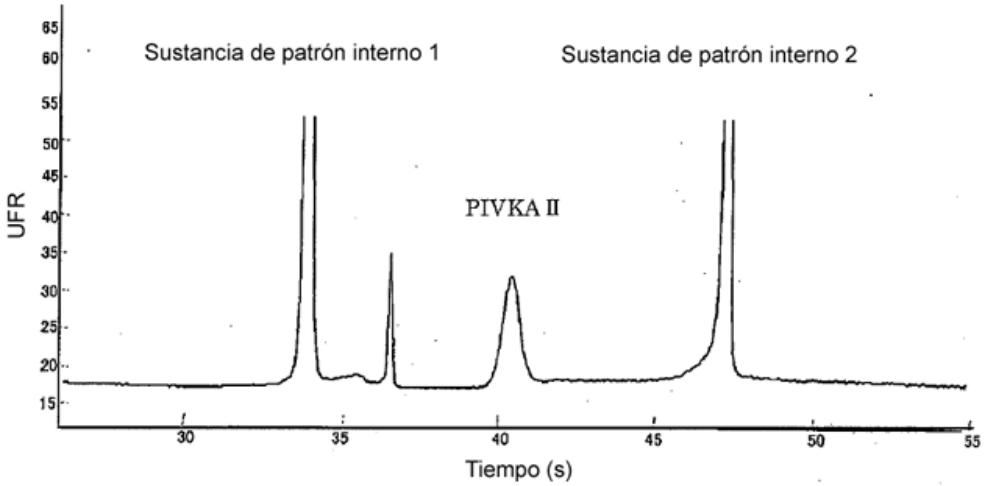

Sustancia de patrón interno 1
AFP-L1
AFP-L3
Sustancia de patrón interno 2
UFR
Tiempo (s)

Fig.5


Sustancia de patrón interno 1
Sustancia de patrón interno 2
PIVKA II
UFR
Tiempo (s)