



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2008 047 689 A1** 2010.03.25

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2008 047 689.7**

(22) Anmeldetag: **18.09.2008**

(43) Offenlegungstag: **25.03.2010**

(51) Int Cl.⁸: **C09B 11/24** (2006.01)

C09B 11/08 (2006.01)

C07D 493/10 (2006.01)

C09K 11/07 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(71) Anmelder:

Helm, Mark, 69124 Heidelberg, DE

(72) Erfinder:

**Helm, Mark, 69124 Heidelberg, DE; Seidu-Larry,
 Salifu, 69123 Heidelberg, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 199 23 168 A1

DE 9 15 128 B

DE 698 22 855 T2

DE 697 31 179 T2

DE 600 05 787 T2

US 2006/02 93 523 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Reaktive Fluoreszenzfarbstoffe und Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe auf Xanthenbasis und Verfahren zur Herstellung derselben**

(57) Zusammenfassung: Technisches Problem:

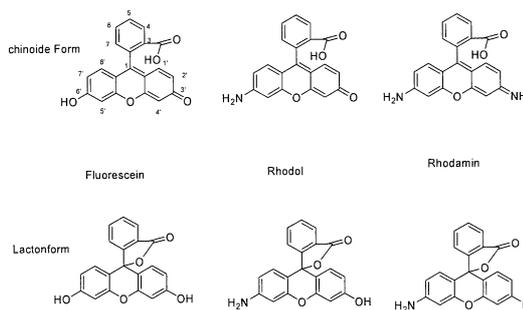
Reaktive Fluoreszenzfarbstoffe, die unter milden Bedingungen reagieren, ändern dabei ihre Farbeigenschaften nicht in vorhersagbarer Weise. Dieser Sachverhalt erschwert eine Erfolgskontrolle der Reaktion und beeinträchtigt analytische Anwendungen.

Lösung:

Reaktive Leuko-Fluoreszenzfarbstoff, die unter milden Bedingungen reagieren und dabei ihre Farbe verändern, werden bereitgestellt. Weiterhin wird ein Verfahren zu deren Synthese bereitgestellt.

Anwendungsgebiet:

Anwendung in der Analytik, Bioanalytik und Diagnose.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige reaktive Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe und reaktive Fluoreszenzfarbstoffe, sowie deren Konjugate und Verfahren zur Herstellung derselben unter besonders milden Bedingungen. Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Stoffe in der Bioanalytik.

[0002] Fluoreszenzfarbstoffe sind besonders für biologische Anwendungen geeignet, in denen ein hochempfindliches Nachweisreagenz erwünscht ist. Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe sind reaktive Vorläufermoleküle von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Farbe und Fluoreszenz erst nach Reaktion mit einem weiteren Molekül erscheinen.

[0003] Typische Vertreter solcher Fluoreszenzfarbstoffe sind Verbindungen, welche auf Xanthen als Grundgerüst basieren. Beispiele für Farbstoffe auf Xanthenbasis sind Fluoresceinderivate, Rhodolderivate und Rhodaminderivate. 3',6'-Diacetylfluorescein ist ein bekanntes Beispiel für einen Leuko-Fluoreszenzfarbstoff, der nach einer Reaktion, die zum Abspalten mindestens einer Acetylgruppe führt farbig und fluoreszierend wird.

[0004] Zu den Fluoresceinfarbstoffen gehören Derivate von 3H-Xanthen-6-ol-3-on, die an der 9-Position mit einer derivatisierten Phenylgruppe, z. B. 2-Carboxyphenylgruppe substituiert sind, während zu „Rhodolfarbstoffen“ Derivate von 6-Amino-3H-xanthen-3-on gehören und Rhodaminderivate von 6-Amino-3H-xanthen-3-imin abgeleitet sind. Fluoresceine, Rhodole und Rhodamine sind typischerweise an der 1-Position mit einer funktionellen Gruppe substituiert, welche in der Lage ist, einen 5- oder 6-gliedrigen Lacton- oder Lactamring zu bilden. Sie können demnach in einer chinoiden Form oder in einer Lactonform vorliegen. [Fig. 1](#) zeigt die chinoiden Formen und die Lactonformen von Fluorescein, Rhodol und Rhodamin. Die Lactonform wird auch als Fluoran bezeichnet. Die vorliegende Erfindung umfasst beide Grundstrukturen.

[0005] Der Großteil der im Markt verfügbaren Farbstoffe verändern bei kovalenter Bindung an ein Zielmolekül ihre Farbeigenschaften nur unwesentlich oder auf schwer vorhersagbare Weise, so dass sich diese Eigenschaft nicht zur Erfolgskontrolle einer Markierungsreaktion verwenden lässt.

[0006] Von Fluorescein abgeleitete Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe, die nach einer Konjugationsreaktion mit Thiolen Fluoreszenz zeigen, sind zwar ebenso beschrieben (Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y., *Science* 1998, 281, 269–272), wie deren Anwendungen in vivo (Griffin BA, Adams SR, Jones J, Tsien RY. *Methods Enzymol.* 2000; 327: 565–78). Jedoch ent-

halten diese giftigen Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe Arsen, was eine Anwendung in biologischen Systemen problematisch gestaltet. Darüber hinaus eignen sich diese Verbindungen nur bedingt zur Markierung von Biomolekülen und reagieren nur mit bestimmten Thiolen in Peptidmotiven.

[0007] Darüber hinaus ist der Großteil der bereits im Markt verfügbaren Farbstoffe unter milden Reaktionsbedingungen nur schwierig und in aufwendiger Weise an das entsprechende Zielmolekül zu binden. Eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und Stabilität des Farbstoffs unter biokompatiblen Bedingungen ist jedoch eine zwingende Voraussetzung beispielsweise für die routinemäßige Anwendung in Analytik und Diagnose.

[0008] Reaktive Xanthenfarbstoffe, die unter milden Bedingungen durch Substitution an der 3' bzw. 6' Position mit einem Zielmolekül koppeln sind nicht bekannt. Dies wird in einer Publikation von Albers et al, (*Journal of the American Chemical Society* (2006), 128(30), 9640–9641) klar, in der beschrieben wird, dass NHS-Derivate von 3',6'-Dibromfluoran unter gewissen Bedingungen mit Aminen gekoppelt werden können, ohne dass Substitution an der 3'- oder 6'-Position stattfindet. Aus dieser Arbeit wird klar, dass Halogene an der 3'- oder 6'-Position in Fluoranen unter weniger harschen Bedingungen nicht reaktiv sind, und sich daher nicht als reaktive Komponente zur Darstellung von Konjugaten mit Biomolekülen eignen.

[0009] Xanthenfarbstoffe werden typischerweise durch Kondensation von zwei Äquivalenten 1,3-Resorcinolen oder 1,3-Aminophenolen mit verschiedenen Derivaten von Benzoesäure, Phtalsäure oder Phtalsäureanhydrid oder Sulfobenzoesäure oder Sulfobenzoesäureanhydrid dargestellt, wie zum Beispiel in DE 6981765 und DE 69731179 beschrieben ist. Unsymmetrische Xanthenfarbstoffe, in denen die 3'- und 6'-Positionen unterschiedlich substituiert sind, wie zum beispielsweise Rhodole, können durch Einsatz je einen Äquivalents zweier unterschiedlicher Resorcinole oder 1,3-Aminophenole erhalten werden. In diesem Fall entstehen Stoffgemische, deren Auftrennung durch Chromatographie langwierig und technisch aufwendig ist. Alternativ können unsymmetrische Xanthenfarbstoffe auch stufenweise aufgebaut werden, wie zum Beispiel in DE 60005787 beschrieben ist. Dazu wird ein ausgewähltes 1,3-Resorcinol oder 1,3-Aminophenol mit einem Äquivalent des entsprechenden Benzoesäure- oder Phtalsäurederivates zu einem Benzophenon kondensiert, wonach es typischerweise isoliert und aufgereinigt werden muss, bevor es mit einem Äquivalent eines anderen 1,3-Resorcinol- oder 1,3-Aminophenolderivats zum Farbstoff kondensiert wird. Die obengenannten Verfahren erfordern hohe Temperaturbedingungen und Säurekatalyse, also Bedingungen, unter denen Bio-

moleküle zersetzt bzw. verändert werden oder unlöslich sind.

[0010] Direkte Umwandlungsreaktionen von Fluoresceinen in Rhodole sind nicht bekannt. Fluorescein kann durch Umsetzung mit einem Chlorierungsreagenz wie Thionylchlorid oder Phosphorylchlorid in 3',6'-Dichlorfluoran überführt werden. Die Synthese von unsymmetrischen Rhodaminen ausgehend von 3',6'-Dichlorfluoran durch nukleophile Substitution der Halogenatome erfolgt in hochsiedenden Lösungsmitteln bei hoher Temperatur oder in der Gegenwart von Lewis-Säuren als Katalysator, also ebenfalls unter solchen Bedingungen, unter denen Biomoleküle zersetzt bzw. verändert werden oder unlöslich sind. US 20060293523 beschreibt die Synthese von unsymmetrischen Rhodaminen aus 3',6'-Dichlorfluoran bei 60°C in Sulfolan unter Verwendung von AlCl_3 als Katalysator. Dabei müssen monosubstituierte Zwischenprodukte (6'-Chlor-3H-xanthen-3'-imine, die am 3'-imin-Stickstoff substituiert sind) aufwendig gereinigt werden.

[0011] In DE 19923168 werden Verfahren zur Synthese von Xanthenfarbstoffen beschrieben, die an mindestens einer der beiden Positionen 3' oder 6' mit einem aliphatischen elektronenziehenden Rest substituiert sind. Jedoch beinhalten die hier beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Xanthenfarbstoffen, ausgehend von wenig reaktivem 3'-6'-Dichlorfluoran, das Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre und wasserfreien Bedingungen, und eine äußerst aufwendige Isolation des Produkts.

[0012] Beispiele für typische bekannte reaktive Fluoreszenzfarbstoffe sind NHS-Derivate, Isothiocyanate, oder Säurechloride von Xanthenfarbstoffen, welche vielfältig eingesetzt werden, um kleine Moleküle, Makromoleküle und Biomoleküle zu markieren. Das Produkt dieser Markierung ist ein Konjugat aus Farbstoff und zu markierendem Molekül. Erwünscht ist eine Fluoreszenzmarkierung unter Bedingungen, welche die zu markierenden Moleküle nicht anderweitig chemisch verändern oder denaturieren. Fluoreszenzmarkierung wird besonders häufig verwendet, wenn mit geringen Stoffmengen solcher Moleküle umgegangen wird, typischerweise im Femtomol bis Nanomol Bereich. Wegen der geringen Stoffmengen ist die Erfolgskontrolle der Fluoreszenzmarkierung schwierig und häufig muss ein Teil der Reaktionsmischung zur Analyse geopfert werden. Eine Erfolgskontrolle z. B. durch leicht messbare Änderung der Farb- oder Fluoreszenzeigenschaften der Reaktivfarbstoffe ist höchst wünschenswert.

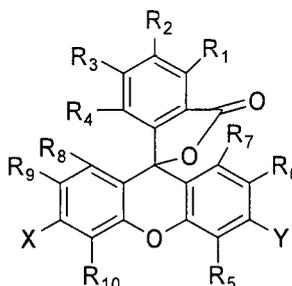
[0013] Somit besteht ein hoher Bedarf an verbesserten reaktiven Leuko-Fluoreszenzfarbstoffen, welche unter einfacher Handhabung bei milden Bedingungen reagieren und durch die erfolgreiche Reaktion, z. B. mit einem nukleophilen Analyten, Farbe und

Fluoreszenz erlangen. Es besteht weiterhin Bedarf an reaktiven Fluoreszenzfarbstoffen, die während einer solchen Markierungsreaktion eine Veränderung ihrer Farb- und Fluoreszenzeigenschaften erfahren, zum Beispiel in Form einer Verschiebung zu größeren Wellenlängen.

[0014] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, reaktive Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe und reaktive Fluoreszenzfarbstoffe bereitzustellen, welche unter milden Bedingungen mit Nucleophilen wie beispielsweise Aminogruppen reagieren, und welche bei dieser Reaktion Farbe und Fluoreszenz entwickeln, oder welche bei dieser Reaktion ihre vorhandenen Farb- bzw. Fluoreszenzeigenschaften verändern.

[0015] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, durch Umsetzung dieser reaktiven Leuko-Fluoreszenzfarbstoffe und reaktiven Fluoreszenzfarbstoffe Xanthenivate zur Verfügung zu stellen, deren Substituenten an den 3'- und 6'-Positionen Makromoleküle und Biomoleküle sind.

[0016] Diese Aufgaben werden durch die in den Ansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst. Insbesondere wird ein Xanthenivat nach Formel 1



Formel 1

bereitgestellt, wobei R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander Wasserstoff, eine aminreaktive Gruppe, Alkyl, Aryl, Heteroaryl, Alkoxy, Cyano, Hydroxy, Halogen, Isocyanat, Carboxy, Sulfonyl, oder Derivate davon sind, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 und R_{10} unabhängig voneinander Wasserstoff, Polyethylen, Jeffamine, substituiertes oder unsubstituiertes Alkyl, Aryl, Heteroaryl, oder Halogenid sind, X eine nukleofuge Abgangsgruppe oder ein Biomolekül ist, und Y eine nukleofuge Abgangsgruppe, ein elektronenziehender Rest, ein substituiertes oder unsubstituiertes Alkohol, oder ein substituiertes oder unsubstituiertes Amin, oder ein Biomolekül ist.

[0017] Der Begriff „Xanthenivat“ wie hierin verwendet umfasst jedes Molekül, welches auf dem Xanthengrundkörper basiert. Darüber hinaus ist der Begriff „Xanthenivat“ nicht auf die eine wie in Formel 1 gezeigt Form beschränkt, sondern umfasst auch die jeweils möglichen Formen unterschiedlicher

Isomere und Tautomere, wie beispielsweise in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0018] Der Begriff „aminreaktive Gruppe“ wie hierin verwendet umfasst funktionelle Gruppen, die mit Aminogruppen anderer Moleküle Konjugate durch kovalente Bindungen ausbilden. Bevorzugte aminreaktive Gruppen sind Säureester, Isothiocanat, Pentafluorphenol, Säureanhydrid, Säurehalogenid oder N-Hydroxysuccinimidester.

[0019] Der Begriff „Alkyl“ umfasst sowohl lineare, als auch verzweigt-kettige C₁-C₁₂ Alkylreste. Beispiele für erfindungsgemäße Alkylgruppen sind Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, Sec-butyl, tert-Butyl, Pentyl, Isopentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl, Dodecyl, Hexadecyl und Octadecyl. Bevorzugte Alkylgruppen weisen 1 bis 10 C-Atome, besonders bevorzugte Alkylgruppen weisen 1 bis 3 C-Atome auf.

[0020] Darüber hinaus ist der Begriff „Alkyl“ hier nicht auf gesättigte Verbindungen beschränkt, sondern umfasst auch zyklische Alkylgruppen, Alkenylgruppen und Alkynylgruppen und deren jeweils mögliche Strukturisomere.

[0021] Der Begriff „zyklische Alkylgruppe“ bezeichnet von Cykloalkanen abgeleitete Substituenten, und beinhaltet auch solche Cykloalkanen, die weitere Alkylgruppen am Ring tragen. Beispiele für erfindungsgemäße zyklische Alkylgruppen sind Cyclopropyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, 4-Methylcyclohexyl, 4-Tert-butylcyclohexyl und Cyclooctyl, wobei eine zyklische Alkylgruppe bevorzugt 3 bis 14 C-Atome und besonders bevorzugt 4 bis 8 C-Atome aufweist.

[0022] Der Begriff „Alkenyl“ bzw. „Alkenylgruppe“ umfasst Alkylgruppen, die eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten.

[0023] Beispiel für Alkenylgruppen sind Vinyl, Allyl, Crotyl, Tiglyl und Prenyl, wobei bevorzugte Alkenylgruppen 2 bis 10 Atome aufweisen, und besonders bevorzugte Alkenylgruppen 3 bis 6 C-Atome aufweisen.

[0024] Der Begriff „Substituiertes Alkyl“ bzw. „Substituierte Alkylgruppen“ bezeichnet wie vorstehend definiert Alkylgruppen, in denen 1 bis 10, bevorzugt 1 bis 5 Wasserstoffatome durch Substituenten wie Cyanogruppen, Azide, Nitrogruppen, Halogene wie Fluor, Chlor, Brom, Jod und ähnliche, Alkylgruppen wie vorstehend definiert, Alkoxygruppen wie Methoxy, Ethoxy und ähnliche, oder Aminogruppen ersetzt sind.

[0025] Beispiele für bevorzugte substituierte Alkyle sind Chloromethyl, 2-Chloroethan, 3-Chloropropan, Trifluoromethan, 2,2,2-Trifluoroethansulfonat,

3,3,3-Trifluoropropan und Trichloromethan.

[0026] Der Begriff „Aryl“ bzw. „Arylgruppe“ umfasst sowohl monocyclische als auch multizyklische Aromaten, zum Beispiel Phenyl, Naphthyl und Anthracenyl. Die Arylgruppe kann 1 bis 5, bevorzugt 1 bis 3 Substituenten aufweisen, welche keine wesentliche Reaktivität gegenüber Sulfonylchloriden zeigen. Beispiele für solche Substituenten sind Cyanogruppen, Azide, Nitrogruppen, Halogene wie Fluor, Chlor, Brom, Jod und ähnliche, Alkylgruppen wie vorstehend definiert, Alkoxygruppen wie Methoxy, Ethoxy und ähnliche.

[0027] Beispiele für erfindungsgemäße substituierte Arylgruppen sind Tolylyl, Xylyl, Methoxyphenyl, Methylthiophenyl, Methoxycarbonylphenyl, Chlorophenyl, Bromophenyl, Iodophenyl, Dimethylaminophenyl, Diethylaminophenyl, Cyanophenyl, Pentafluorophenyl, Tetrafluorophenyl, Trifluorophenyl, Fluoronitrophenyl, Azidophenyl. Bevorzugte Arylgruppen sind Nitrophenyl, Dinitrophenyl und Triinitrophenyl.

[0028] Der Begriff „Heteroaryl“ bzw. „Heteroarylgruppe“ umfasst monocyclische oder polycyclische aromatische Gruppen, die mindestens ein, bevorzugt ein bis drei Heteroatome, ausgewählt aus Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel, enthalten.

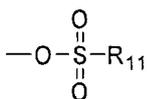
[0029] Beispiele für Heteroaryle sind 5- bis 6-gliedrige Monocyclen wie Furyl, Thiophenyl, Pyrrolyl, Pyridyl und ähnliche, und Polycyclen wie Benzofuryl, Xanthenyl, Coumarinyl, Dibenzofuryl, Thianthrenyl, Indolyl, Acridinyl und ähnliche. Die Heteroarylgruppe kann 1 bis 5, bevorzugt 1 bis 3 Substituenten, wie vorstehend für Arylgruppen definiert, aufweisen.

[0030] Der Begriff „Polyethylen“ umfasst hierin Oligomere oder Polymere von Ethylenoxid von der allgemeinen Formel HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H, worin n die Anzahl der Ethylenoxideinheiten darstellt. Die Werte für n können zwischen 1 und 20, bevorzugt zwischen 2 und 10, und besonders bevorzugt zwischen 3 und 5 liegen.

[0031] Der Begriff „Jeffamin“ umfasst hierin Polyetheramine, bevorzugt primäre Diaminderivate von erfindungsgemäßen Polyethylenen mit der allgemeinen Formel H₂N-(CH₂-CH₂-O)_n-CH₂-CH₂-NH₂, worin n die Anzahl der Ethylenoxideinheiten darstellt. Die Werte für n können zwischen 1 und 20, bevorzugt zwischen 2 und 10, und besonders bevorzugt zwischen 3 und 5 liegen.

[0032] Der Begriff „nukleofuge Abgangsgruppe“ wie hierin verwendet umfasst Sulfonate, Sulfate, Phosphate, Phosphonate, und deren Derivate, sowie ähnliche elektronenziehende Gruppen. Bevorzugte nukleofuge Abgangsgruppen sind Sulfonate.

[0033] Der Begriff „Sulfonat“ umfasst Substituenten entsprechend der in Formel 2 gezeigten Struktur,



Formel 2

wobei R₁₁ ein wie vorstehend definierter substituierter oder unsubstituierter Alkyl-, substituierter oder unsubstituierter Aryl-, substituierter oder unsubstituierter Alkylaryl, oder substituierter oder unsubstituierter Heteroarylrest ist.

[0034] Bevorzugte Sulfonate sind Ethansulfonat, 1-Propansulfonat, 2-Propanesulfonat, 1-Butansulfonat, 2-Methyl-1-propansulfonat, Cyclopropansulfonat, Cyclobutansulfonat, Cyclopentansulfonat, Cyclohexansulfonat, 1-Octansulfonat, 1-Nonansulfonat, 1-Decansulfonat, 1-Dodecansulfonat, 1-Hexadecansulfonat, 1-Octadecansulfonat Chloromethansulfonat, 2-Chloroethanesulfonyl, 3-Chloropropansulfonyl, 1-Hexansulfonat, Trifluoromethansulfonat, 2,2,2-Trifluoroethansulfonat, 3,3,3-Trifluoropropan-1-sulfonat, Trichloromethansulfonat, Benzolsulfonat, o-Toluolsulfonat, Phenylmethansulfonat, 4-tert-Butylbenzolsulfonat, Pentamethylbenzolsulfonat, 2-Thiophenesulfonyl, 4-(Acetylamino benzolsulfonat, Benzolsulfonat, 4-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, Dansylsulfonat, Dabsylisulfonat, 9H-Fluoren-9-Sulfonat, 2-Oxo-2H-1-benzopyran-6-sulfonat, 1-Naphthylsulfonat, 2-Naphthylsulfonat, Anthracensulfonat, Biphenyl-4-sulfonat, 8-Chinolylsulfonat, 4-Acetylbenzenesulfonat, 2-Fluorobenzolsulfonat, 3-Fluorobenzolsulfonat, 4-Fluorobenzolsulfonat, 2-Cyanobenzolsulfonat, 3-Cyanobenzolsulfonat, 4-Cyanobenzolsulfonat, 2-Chlorobenzolsulfonat, 3-Chlorobenzolsulfonat, 4-Chlorobenzolsulfonat, 2-Bromobenzolsulfonat, 3-Bromobenzolsulfonat, 4-Bromobenzolsulfonat, 2-Iodobenzolsulfonat, 3-Iodobenzolsulfonat, 4-Iodobenzolsulfonat, (E)-2-Phenylethensulfonat, 4-Methylbenzolsulfonat, 4-Ethylbenzolsulfonat, 3,5-Dimethylbenzolsulfonat, 2-Methoxybenzolsulfonat, 3-Methoxybenzolsulfonat, 4-Methoxybenzolsulfonat, Fluoromethylbenzolsulfonat Chloromethylbenzolsulfonat Bromomethylbenzolsulfonat, Iodomethylbenzolsulfonat, Difluorobenzolsulfonat, Dichlorobenzolsulfonat, Dibromobenzolsulfonat, Diodobenzolsulfonat, Chlorofluorobenzolsulfonat, Bromofluorobenzolsulfonat, Iodofluorobenzolsulfonat, Trifluorobenzolsulfonat, Tetrafluorobenzolsulfonat, Pentafluorobenzolsulfonat, 2-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, 3-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, 4-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, Chlorothiophenesulfonat, 4-Isocyanatobenzolsulfonat, 4-Propylbenzolsulfonat, 4-Isopropylbenzolsulfonat, 4-Fluoro-3-cyanobenzolsulfonat, 2-Nitrobenzolsulfonat, 3-Nitrobenzolsulfonat, 4-Nitrobenzolsulfonat, Dinitrobenzolsulfonat, Trinitrobenzolsulfonat, Methylnitro-

benzolsulfonat, Methyl-dinitrobenzolsulfonat, Dimethoxybenzolsulfonat, (Difluoromethoxy)benzolsulfonat, (Trifluoromethoxy)benzolsulfonat, 2,4,6-Trimethylbenzolsulfonat, 4-(Phenylazo)benzolsulfonat, 4-Azidobenzolsulfonat, p-Toluolsulfonat und Methansulfonat.

[0035] Besonders bevorzugte Sulfonate sind p-Toluolsulfonat und Methansulfonat.

[0036] Der Begriff „Biomolekül“ umfasst jedes Molekül, welches in lebenden Organismen vorkommt oder auf solchen basiert. Darüber hinaus ist der Begriff „Biomolekül“ nicht auf Moleküle beschränkt, die in lebenden Organismen synthetisiert werden oder dort vorkommen, sondern umfasst auch Derivate davon, die durch chemische oder enzymatische Modifikation außerhalb lebender Organismen in vitro erzeugt werden, sowie gleiche oder ähnliche Moleküle und deren Derivate, die vollständig außerhalb lebender Organismen in vitro synthetisiert werden. Weiterhin ist der Begriff „Biomolekül“, wie hierin verwendet, nicht auf Moleküle beschränkt, von denen bekannt ist, dass sie in lebenden Organismen vorkommen, sondern umfasst weiterhin Moleküle, die zu Stoffklassen gehören, von denen bekannt ist, dass sie in lebenden Organismen vorkommen, sowie Derivate hiervon.

[0037] Beispiele für erfindungsgemäße Biomoleküle sind Haptene, Antigene, Antikörper, Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Mono- oder Oligo- oder Polynucleotide, Nucleoside, Oligosaccharide, Polysaccharide, Locked Nucleic Acids (LNA), Peptide Nucleic Acids (PNA).

[0038] Der Begriff Nukleophil umfasst alle Moleküle, die mit den erfindungsgemäßen Xanthenderivaten unter Substitution einer Sulfonatgruppe reagieren können. Beispiel für Nukleophile sind primäre Amine, sekundäre Amine, Azidanion, Aniline, Hydrazine, Hydrazone, Hydroxyanionen, Alkoholate, Thiole, Thiolate, Mercaptane und ähnliche. Der Begriff Nukleophil umfasst nicht nur kleine Moleküle sondern auch Makromoleküle und auch Biomoleküle, welche mit den erfindungsgemäßen Xanthenderivaten unter Substitution einer Sulfonatgruppe reagieren können.

[0039] Bevorzugte erfindungsgemäße Xanthenderivate sind in [Fig. 3](#), [Fig. 4](#) und [Fig. 10](#) abgebildet, besonders bevorzugte erfindungsgemäße Xanthenderivate sind in den [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) gezeigt.

[0040] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Xanthderivat wie vorstehend definiert, wobei mindestens einer der Reste R₁ bis R₁₀ eine aktivierbare Gruppe, ausgewählt aus einem Säureester, Isothiocanat, Pentafluorphenol, Säureanhydrid, Säurehalogenid oder N-Hydroxysuccinimidester ist.

[0041] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein

Xanthenderivat wie vorstehend definiert, wobei X und/oder Y ein wie vorstehend definiertes Sulphonat darstellt/darstellen.

[0042] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein Xanthenderivat wie vorstehend definiert, wobei X und/oder Y ausgewählt ist/sind aus Methansulfonat, Ethansulfonat, 1-Propansulfonat, 2-Propansulfonat, 1-Butansulfonat, 2-Methyl-1-propansulfonat, Cyclopropansulfonat, Cyclobutansulfonat, Cyclopentansulfonat, Cyclohexansulfonat, 1-Octansulfonat, 1-Nonansulfonat, 1-Decansulfonat, 1-Dodecansulfonat, 1-Hexadecansulfonat, 1-Octadecansulfonat Chloromethansulfonat, 2-Chloroethansulfonat, 3-Chloropropansulfonat, 1-Hexansulfonat, Trifluoromethansulfonat, 2,2,2-Trifluoroethansulfonat, 3,3,3-Trifluoropropan-1-sulfonat, Trichloromethansulfonat, Benzolsulfonat, p-Toluolsulfonat, o-Toluolsulfonat, Phenylmethansulfonat, 4-tert-Butylbenzolsulfonat, Pentamethylbenzolsulfonat, 2-Thiophenesulfonyl, 4-(Acetylamino benzolsulfonat, Benzolsulfonat, 4-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, Dansylsulfonat, Dabsylsulfonat, 9H-Fluoren-9-Sulfonat, 2-Oxo-2H-1-benzopyran-6-sulfonat, 1-Naphthylsulfonat, 2-Naphthylsulfonat, Anthracensulfonat, Biphenyl-4-sulfonat, 8-Chinolylsulfonat, 4-Acetylbenzolsulfonat, 2-Fluorobenzolsulfonat, 3-Fluorobenzolsulfonat, 4-Fluorobenzolsulfonat, 2-Cyanobenzolsulfonat, 3-Cyanobenzolsulfonat, 4-Cyanobenzolsulfonat, 2-Chlorobenzolsulfonat, 3-Chlorobenzolsulfonat, 4-Chlorobenzolsulfonat, 2-Bromobenzolsulfonat, 3-Bromobenzolsulfonat, 4-Bromobenzolsulfonat, 2-Iodobenzolsulfonat, 3-Iodobenzolsulfonat, 4-Iodobenzolsulfonat, (E)-2-Phenylethensulfonat, 4-Methylbenzolsulfonat, 4-Ethylbenzolsulfonat, 3,5-Dimethylbenzolsulfonat, 2-Methoxybenzolsulfonat, 3-Methoxybenzolsulfonat, 4-Methoxybenzolsulfonat, Fluoromethylbenzolsulfonat Chloromethylbenzolsulfonat Bromomethylbenzolsulfonat, Iodomethylbenzolsulfonat, Difluorobenzolsulfonat, Dichlorobenzolsulfonat, Dibromobenzolsulfonat, Dijodobenzolsulfonat, Chlorofluorobenzolsulfonat, Bromofluorobenzolsulfonat, Iodofluorobenzolsulfonat, Trifluorobenzolsulfonat, Tetrafluorobenzolsulfonat, Pentafluorobenzolsulfonat, 2-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, 3-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, 4-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, Chlorothiophenesulfonat, 4-Isocyanatobenzolsulfonat, 4-Propylbenzolsulfonat, 4-Isopropylbenzolsulfonat, 4-Fluoro-3-cyanobenzolsulfonat, 2-Nitrobenzolsulfonat, 3-Nitrobenzolsulfonat, 4-Nitrobenzolsulfonat, Dinitrobenzolsulfonat, Trinitrobenzolsulfonat, Methylnitrobenzolsulfonat, Methyl-dinitrobenzolsulfonat, Dimethoxybenzolsulfonat, (Difluoromethoxy)benzolsulfonat, (Trifluoromethoxy)benzolsulfonat, 2,4,6-Trimethylbenzolsulfonat, 4-(Phenylazo)benzolsulfonat und 4-Azidobenzolsulfonat.

[0043] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein Xanthenderivat wie vorstehend definiert, wobei X und/oder Y aus p-Tolu-

olsulfonat und Methansulfonat ausgewählt ist/sind.

[0044] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Xanthenderivat wie vorstehend definiert, wobei X und/oder Y ein Biomolekül darstellt/darstellen.

[0045] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein Xanthenderivat wie vorstehend definiert, wobei X ein Biomolekül und Y ein Sulphonat ist.

[0046] Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft ein Xanthenderivat wie vorstehend definiert, wobei das Biomolekül aus einer Nukleinsäure, einem Oligonucleotid, einem Nucleotid, einem Nucleosid, einem Peptid oder einem Protein ausgewählt ist.

[0047] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines wie vorstehend definierten Xanthenderivats, umfassend die Schritte: a) Auflösen eines Fluoresceinderivates in Pyrimidin und Umsetzen mit einem Sulfonylchlorid, b) Evaporieren von Lösungsmittel, c) Entfernung von residualem Sulfonylchlorid und d) Isolierung und Aufreinigung des Xanthenderivats.

[0048] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein wie vorstehend definiertes Verfahren zur Herstellung eines wie vorstehend definierten Xanthenderivats, wobei das Verfahren weiter zwischen Schritt c) und d) den Schritt c') „Umsetzung unter milden Bedingungen mit einem Äquivalent eines Nucleophils“ umfasst.

[0049] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein wie vorstehend definiertes Verfahren zur Herstellung eines wie vorstehend definierten Xanthenderivats, wobei das Verfahren weiter zwischen Schritt c) und d) den Schritt c') Umsetzung unter milden Bedingungen mit mindestens zwei Äquivalent eines Nucleophils umfasst.

[0050] Eine weitere Ausführungsform betrifft ein wie vorstehend definiertes Verfahren, wobei das Nucleophil ein Biomolekül ist.

[0051] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Verwendung des Xanthenderivats wie vorstehend definiert, zum Nachweis eines Biomoleküls in einer Probe.

[0052] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine Verwendung des Xanthenderivats wie vorstehend definiert, wobei das Biomolekül ein Protein oder eine Nukleinsäure ist.

[0053] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Xanthenkongugat, erhalten durch Umsetzung eines wie vorstehend definierten Xanthenderivats mit einem Biomolekül in einem wie vorstehend definierten Verfahren.

[0054] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kit, umfassend ein Xanthenderivat wie vorstehend definiert, und gegebenenfalls einen oder mehrere Hilfsstoffe.

[0055] Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Kit wie vorstehend definiert, wobei der eine oder die mehreren Hilfsstoff(e) aus Lösungsmittel, Puffer oder Salzen, Konservierungstoffen und Stabilisatoren ausgewählt sind.

[0056] Die Figuren zeigen:

[0057] [Fig. 1](#) zeigt die typischen Vertreter der Xanthenfarbstoffe: Fluorescein, Rhodol, Rhodamin, jeweils in der chinoiden und der Lactonform dargestellt.

[0058] [Fig. 2](#) zeigt verschiedene Isomere des Xanthengrundkörpers.

[0059] [Fig. 3](#) zeigt Synthese und Charakterisierung von Fluorescein-6'-sulfonsäureester nach Methode A wie in Beispiel 1.

[0060] [Fig. 4](#) zeigt Synthese und Charakterisierung von Fluorescein-3',6'-disulfonsäureester nach Methode B wie in Beispiel 2.

[0061] [Fig. 5](#) zeigt Synthese und Charakterisierung von 3',6'-Di-Piperidinylrhodamin nach Methode C wie in Beispiel 3.

[0062] [Fig. 6](#) zeigt Synthese und Charakterisierung von Rhodol-3'-jeffamin-148 nach Methode C wie in Beispiel 3.

[0063] [Fig. 7](#) zeigt Synthese und Charakterisierung von 3',6'-Di-Piperidinylrhodamin nach Methode D wie in Beispiel 4.

[0064] [Fig. 8](#) zeigt Synthese und Charakterisierung von 3'6'-Bis(jeffamin-154)-rhodamin nach Methode D wie in Beispiel 4.

[0065] [Fig. 9](#) zeigt Charakterisierung und Synthese von 3-Glycin-6'-(jeffamin 154)-rhodamin nach Methode E wie in Beispiel 5.

[0066] [Fig. 10](#) zeigt Synthese und Charakterisierung eines Fluoreszenzmarkierten Peptides nach Methode F wie in Beispiel 6.

[0067] Die Xanthenderivate der vorliegenden Erfindung reagieren mit Biomolekülen und Nukleophilen unter überraschend milden Bedingungen unter Substitution der Sulfonatgruppen an den 3'- und 6'-Positionen. Bei der Reaktion mit Biomolekülen entstehen in ihren Eigenschaften vorteilhafte Xanthenkongjugate. Die spektralen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Xanthenderivate verändern sich bei einer sol-

chen Reaktion überraschend stark, zum Teil handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Xanthenderivaten vorteilhafterweise um Leukofarbstoffe, die vor der Reaktion gar keine Farbe zeigen. Die erfindungsgemäßen Farbstoffe und Leukofarbstoffe sind unerwartet leicht zu synthetisieren und zu derivatisieren und ermöglichen so einen vorteilhaften Einsatz in der bioanalytischen Chemie, zum Beispiel überraschend sensitive Nachweise von Biomolekülen in einer Probe insbesondere unter milden Bedingungen.

Beispiele

Beispiel 1: Synthese von Fluorescein-6'-sulfonsäureester (Methode A).

[0068] Zu einer 10% (w/v) Lösung von Fluorescein in Pyridin werden unter Rühren bei 0°C innerhalb 1 Stunde langsam 0,9 Moläquivalente eines Sulfonsäurechlorids gegeben. Nach weiteren 30 min bei 0°C wird die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur noch 60 min weitergerührt. Das Pyridin wird im Vakuum abdestilliert.

Beispiel 2: Synthese von Fluorescein-3',6'-disulfonsäureester (Methode B).

[0069] Zu einer 10% (w/v) Lösung von Fluorescein in Pyridin werden unter Rühren bei Raumtemperatur innerhalb 1 Stunde langsam 4 Moläquivalente eines Sulfonsäurechlorids gegeben. Es wird weitere 120 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Pyridin und überschüssiges Sulfonsäurechlorid werden im Vakuum abdestilliert.

Beispiel 3: Umwandlung von Fluorescein in Rhodole (Methode C)

[0070] Zu einer 10% (w/v) Lösung von Fluorescein in Pyridin werden unter Rühren bei 0°C innerhalb 1 Stunde langsam 0,9 Moläquivalente eines Sulfonsäurechlorids gegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur noch 60 min weitergerührt. Dann wird auf 0°C gekühlt und Piperidin im Überschuss zugegeben. Nach weiteren 60 min Rühren bei 0°C wird die Reaktionsmischung im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt.

Beispiel 4: Umwandlung von Fluorescein in symmetrische Rhodamine (Methode D)

[0071] Zu einer 10% (w/v) Lösung von Fluorescein in Pyridin werden unter Rühren bei Raumtemperatur innerhalb 1 Stunde langsam 4 Moläquivalente eines Sulfonsäurechlorids gegeben. Es wird weitere 120 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Dann wird die Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockene eingeeengt, um überschüssiges Sulfonsäurechlorid zu entfernen. Der Rückstand wird in Pyridin gelöst und nach Kühlen auf 0°C werden 6 Moläquivalente Amin

in einer Portion zu gefügt und es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt.

Beispiel 5: Umwandlung von Fluoresceinen in asymmetrische Rhodamine (Methode E).

[0072] Zu einer 10% (w/v) Lösung von Fluorescein in Pyridin werden unter Rühren bei Raumtemperatur innerhalb 1 Stunde langsam 4 Moläquivalente eines Sulfonsäurechlorids gegeben. Es wird weitere 120 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Dann wird die Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockene eingeeengt, um überschüssiges Sulfonsäurechlorid zu entfernen. Der Rückstand wird in Pyridin gelöst und eine 10%ige (w/v) Lösung von 1 Moläquivalent eines Amins in Ethanol wurde im Zeitraum von 60 Minuten unter Rühren bei 0° zugetropft. Die Mischung wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Danach werden 2,5 Moläquivalente eines anderen Amins zugegeben und weitere 2 Stunden gerührt.

[0073] Die Reaktionsmischung wird im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt.

Beispiel 6: Fluoreszenzmarkierung von Peptiden auf der Festphase (Methode F)

[0074] Oligopeptide werden nach Standardmethoden der Fmoc-Chemie in einer 2 ml Plastikspritze im 100 µmol Massstab entsprechend 175 mg Rink AM Harz (Firma Novabiochem) synthetisiert. Es wird eine Standardmethode angewendet, wie sie z. B. im Katalog der Firma Novabiochem zu finden ist. Zur N-terminalen Fluoreszenzmarkierung wird nach der Entfernung der letzten N-terminalen FMoc Schutzgruppe festes 3',6'-Dimesylfluoran (10 Moläquivalente) zum Harz in die Spritze gegeben und in 2 ml Pyridin gelöst. Die Spritze wird über Nacht geschüttelt. Der Fortgang der Reaktion lässt sich an einer orange-lila Färbung der Festphase erkennen. Die Reaktionsmischung wird von der Festphase entfernt, die Festphase mehrmals mit Dichlormethan gewaschen und dann getrocknet. Das Produkt wird mit einer Lösung von TFA in Dichlormethan (95 v/v) von der Festphase gespalten, filtriert und lyophilisiert.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

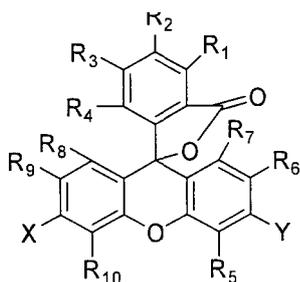
- DE 6981765 [0009]
- DE 69731179 [0009]
- DE 60005787 [0009]
- US 20060293523 [0010]
- DE 19923168 [0011]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y., Science 1998, 281, 269–272 [0006]
- Griffin BA, Adams SR, Jones J, Tsien RY. Methods Enzymol. 2000; 327: 565–78 [0006]
- Albers et al, (Journal of the American Chemical Society (2006), 128(30), 9640–9641) [0008]

Patentansprüche

1. Xanthenderivat nach Formel 1,



Formel 1

wobei R_1 , R_2 , R_3 und R_4 unabhängig voneinander aus Wasserstoff, substituiertem oder unsubstituiertem Alkyl, substituiertem oder unsubstituiertem Aryl, substituiertem oder unsubstituiertem Heteroaryl, Alkoxy, Cyano, Hydroxy, Halogen, Isocyanat, Carboxy, Sulfonyl, oder Derivaten davon ausgewählt sind, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 und R_{10} unabhängig voneinander aus Wasserstoff, substituiertem oder unsubstituiertem Alkyl, substituiertem oder unsubstituiertem Aryl, substituiertem oder unsubstituiertem Heteroaryl, Alkoxy, Cyano, Hydroxy, Halogen, Isocyanat, Carboxy, Sulfonyl, Polyethylen, Jeffamin oder Derivaten davon ausgewählt sind,

X eine nukleofuge Abgangsgruppe, ausgewählt aus Sulfonat, Sulfat, Phosphat, und Phosphonat, oder ein Biomolekül ist, und

Y eine nukleofuge Abgangsgruppe, ausgewählt aus Sulfonat, Sulfat, Phosphat, und Phosphonat, oder ein Jeffamin, ein Polyethylen, ein substituiertes oder unsubstituiertes Alkohole, ein substituiertes oder unsubstituiertes Amin, oder ein Biomolekül ist.

2. Xanthenderivat nach Anspruch 1, wobei mindestens einer der Reste R_1 bis R_{10} eine aminreaktive Gruppe, ausgewählt aus einem Säureester, Isothiocyanat, Pentafluorphenol, Säureanhydrid, Säurehalogenid oder N-Hydroxysuccinimidester ist.

3. Xanthenderivat nach Anspruch 1 oder 2, wobei X und/oder Y ein Sulfonat darstellt/darstellen.

4. Xanthenderivat nach Anspruch 3, wobei das Sulfonat ausgewählt ist oder die Sulfonate unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Methansulfonat, Ethansulfonat, 1-Propansulfonat, 2-Propansulfonat, 1-Butansulfonat, 2-Methyl-1-propansulfonat, Cyclopropansulfonat, Cyclobutansulfonat, Cyclopentansulfonat, Cyclohexansulfonat, 1-Octansulfonat, 1-Nonansulfonat, 1-Decansulfonat, 1-Dodecansulfonat, 1-Hexadecansulfonat, 1-Octadecansulfonat Chloromethansulfonat, 2-Chloroethansulfonat, 3-Chloropropansulfonat, 1-Hexansulfonat, Trifluoromethansulfonat, 2,2,2-Trifluoroethansulfonat, 3,3,3-Trifluoropropan-1-sulfonat, Trichloromethansulfonat, Benzolsulfonat, p-Toluolsulfonat, o-Toluol-

sulfonat, Phenylmethansulfonat, 4-tert-Butylbenzolsulfonat, Pentamethylbenzolsulfonat, 2-Thiophenylsulfonyl, 4-(Acetylamino benzolsulfonat, Benzolsulfonat, 4-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, Dansylsulfonat, Dabsylsulfonat, 9H-Fluoren-9-Sulfonat, 2-Oxo-2H-1-benzopyran-6-sulfonat, 1-Naphthylsulfonat, 2-Naphthylsulfonat, Anthracensulfonat, Biphenyl-4-sulfonat, 8-Chinolylsulfonat, 4-Acetylbenzolsulfonat, 2-Fluorobenzolsulfonat, 3-Fluorobenzolsulfonat, 4-Fluorobenzolsulfonat, 2-Cyanobenzolsulfonat, 3-Cyanobenzolsulfonat, 4-Cyanobenzolsulfonat, 2-Chlorobenzolsulfonat, 3-Chlorobenzolsulfonat, 4-Chlorobenzolsulfonat, 2-Bromobenzolsulfonat, 3-Bromobenzolsulfonat, 4-Bromobenzolsulfonat, 2-Iodobenzolsulfonat, 3-Iodobenzolsulfonat, 4-Iodobenzolsulfonat, (E)-2-Phenylethensulfonat, 4-Methylbenzolsulfonat, 4-Ethylbenzolsulfonat, 3,5-Dimethylbenzolsulfonat, 2-Methoxybenzolsulfonat, 3-Methoxybenzolsulfonat, 4-Methoxybenzolsulfonat, Fluoromethylbenzolsulfonat Chloromethylbenzolsulfonat Bromomethylbenzolsulfonat, Iodomethylbenzolsulfonat, Difluorobenzolsulfonat, Dichlorobenzolsulfonat, Dibromobenzolsulfonat, Dijodobenzolsulfonat, Chlorofluorobenzolsulfonat, Bromofluorobenzolsulfonat, Iodofluorobenzolsulfonat, Trifluorobenzolsulfonat, Tetrafluorobenzolsulfonat, Pentafluorobenzolsulfonat, 2-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, 3-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, 4-(Trifluoromethyl)benzolsulfonat, Chlorothiophenesulfonat, 4-Isocyanatobenzolsulfonat, 4-Propylbenzolsulfonat, 4-Isopropylbenzolsulfonat, 4-Fluoro-3-cyanobenzolsulfonat, 2-Nitrobenzolsulfonat, 3-Nitrobenzolsulfonat, 4-Nitrobenzolsulfonat, Dinitrobenzolsulfonat, Trinitrobenzolsulfonat, Methylnitrobenzolsulfonat, Methyl-dinitrobenzolsulfonat, Dimethoxybenzolsulfonat, (Difluoromethoxy)benzolsulfonat, (Trifluoromethoxy)benzolsulfonat, 2,4,6-Trimethylbenzolsulfonat, 4-(Phenylazo)benzolsulfonat und 4-Azidobenzolsulfonat.

5. Xanthenderivat nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Sulfonat oder die Sulfonate unabhängig voneinander aus p-Toluolsulfonat und Methansulfonat ausgewählt ist/sind.

6. Xanthenderivat nach Anspruch 1 oder 2, wobei X und/oder Y ein Biomolekül darstellt/darstellen.

7. Xanthenderivat nach Anspruch 1 oder 2, wobei X ein Sulfonat und Y ein Biomolekül ist, oder wobei X ein Biomolekül und Y ein Sulfonat ist.

8. Xanthenderivat nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Biomolekül aus einer Nukleinsäure, einem Oligonukleotid, einem Nukleotid, einem Nukleosid, einem Peptid oder einem Protein ausgewählt ist.

9. Verfahren zur Herstellung eines Xanthenderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend die Schritte:

a) Auflösen eines Fluoresceinderivates in Pyrimidin

- und Umsetzen mit einem Sulfonylchlorid,
- b) Evaporieren von Lösungsmittel
- c) Entfernung von residualem Sulfonylchlorid
- d) Isolierung und Aufreinigung des Xanthenderivats.

10. Verfahren zur Herstellung eines Xanthenderivats nach Anspruch 9, wobei das Verfahren weiter zwischen Schritt c) und d) den Schritt c') Umsetzung unter milden Bedingungen mit einem Äquivalent eines Nukleophils umfasst.

11. Verfahren zur Herstellung eines Xanthenderivats nach Anspruch 9, wobei das Verfahren weiter zwischen Schritt c) und d) den Schritt c') Umsetzung unter milden Bedingungen mit mindestens zwei Äquivalent eines Nukleophils umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Nukleophil ein Biomolekül ist.

13. Verwendung des Xanthenderivats nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Nachweis eines Biomoleküls in einer Probe.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das Biomolekül ein Protein oder eine Nukleinsäure ist.

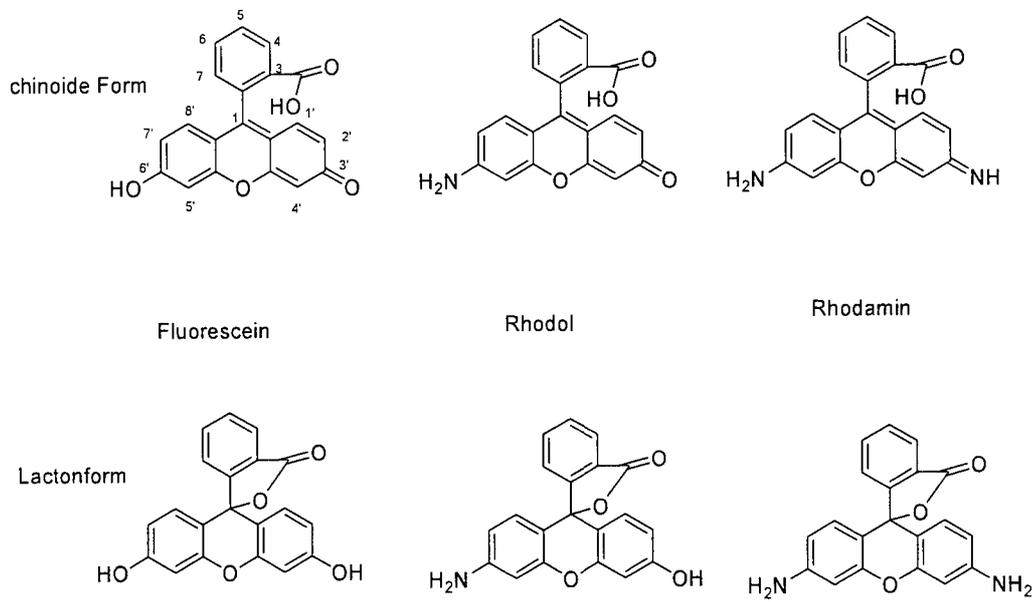
15. Xanthenkonjugat, erhalten durch Umsetzung eines Xanthenderivats nach einem der Ansprüche 1–4 mit einem Biomolekül in einem Verfahren nach Anspruch 12.

16. Kit, umfassend das Xanthenderivat nach einem der Ansprüche 1–8 und gegebenenfalls einen oder mehrere Hilfsstoffe.

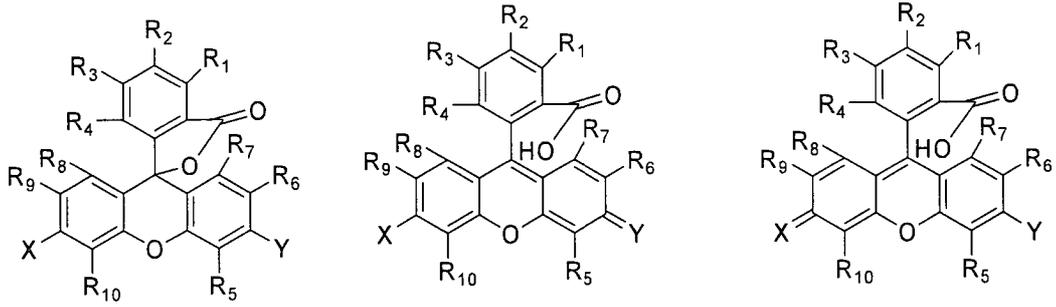
17. Kit nach Anspruch 16, wobei der eine oder die mehreren Hilfsstoff(e) aus Lösungsmittel, Puffer oder Salzen, Konservierungsstoffen und Stabilisatoren ausgewählt sind.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



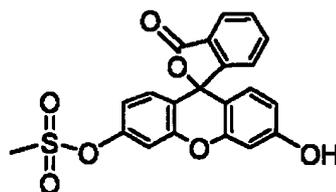
Figur 1



Figur 2

Synthese von

3'-Mesityl-fluorescein



Chemical Formula: C₂₇ H₂₀ O₅ S
 Exact Mass: 410.05

Durchführung

Methode A

Ansatz:

Fluorescein 1g (3,0 mmol) Methansulfonsäurechlorid 232 μ L (2,7 mmol)

Reinigung:

Umkristallisierung aus Dichlormethan/Methanol (98/2 v/v).

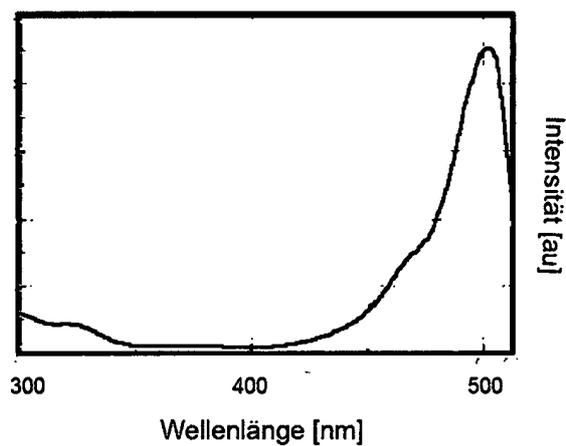
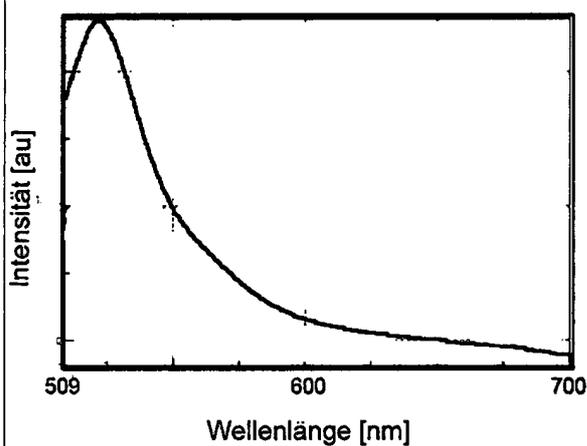
Ausbeute

90%

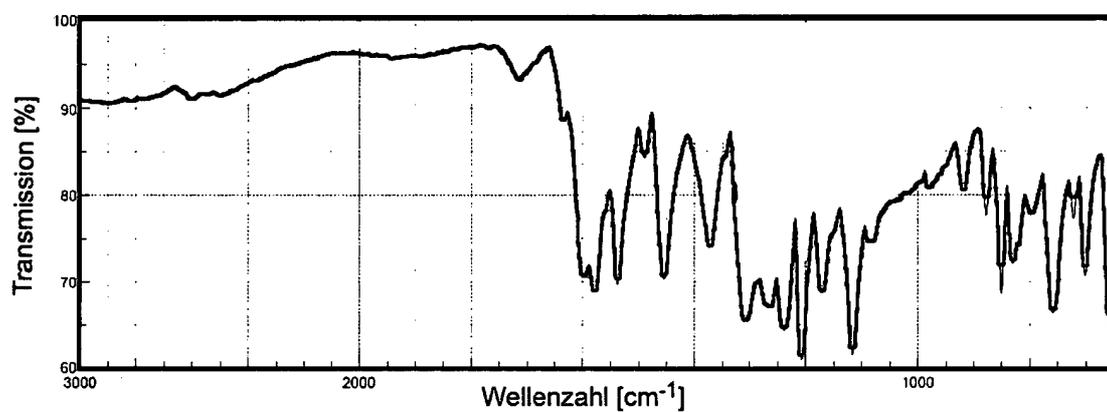
Charakterisierung

Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung bei 499 nm

Anregungsspektrum für Fluoreszenzemission bei 522 nm



FT-IR

Maldi: m/z 411 [MH]⁺.

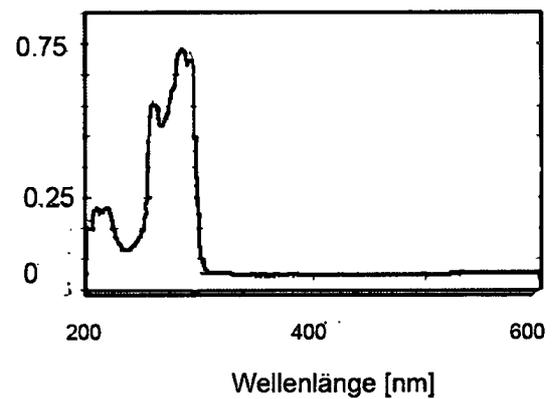
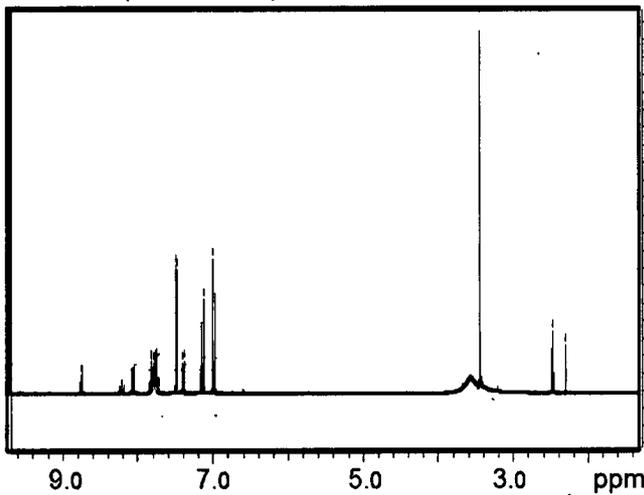
Figur 3

Synthese von

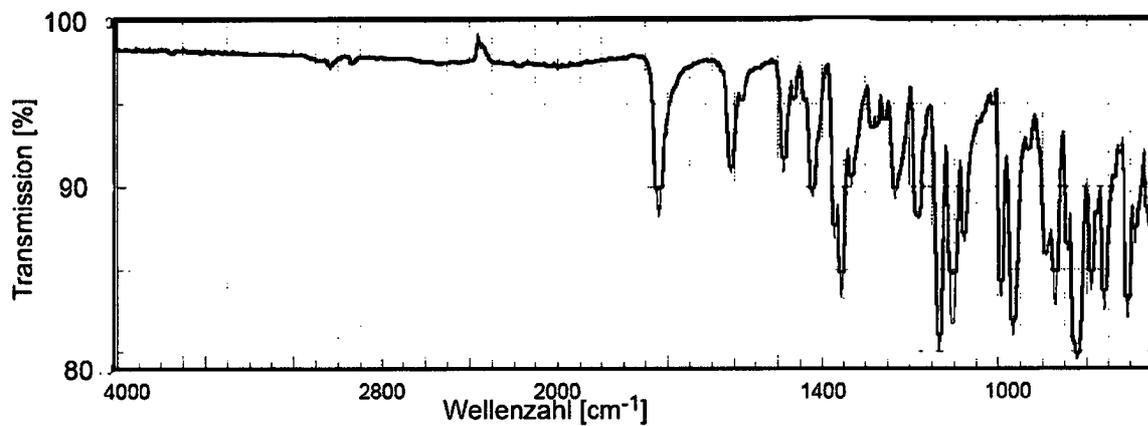
3',6'-Dimesylfluoran



Durchführung:	Methode B
Ansatz:	Fluorescein: 3g (9,0 mmol) Methansulfonsäurechlorid 2,78 ml (36 mmol)
Reinigung:	Umkristallisieren aus Dichlormethan
Ausbeute :	95%
Charakterisierung	1H -NMR, UV- VIS Absorptionsspektrum, FT-IR
1H -NMR (D6-DMSO)	UV-VIS Absorptionsspektrum

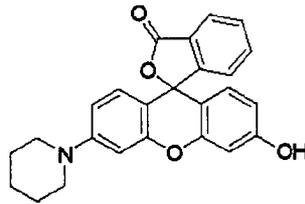


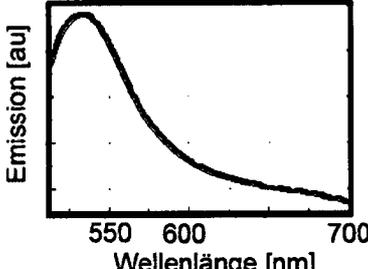
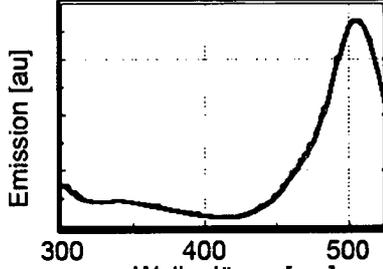
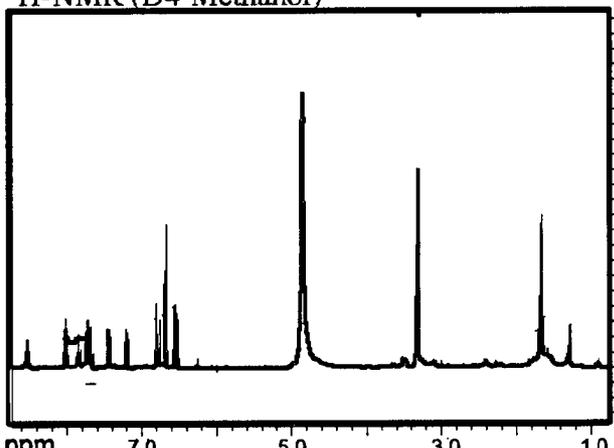
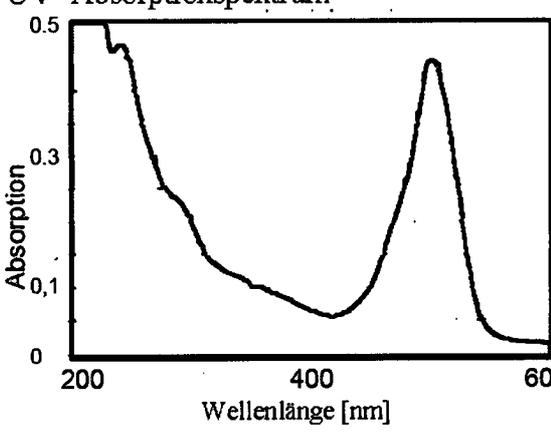
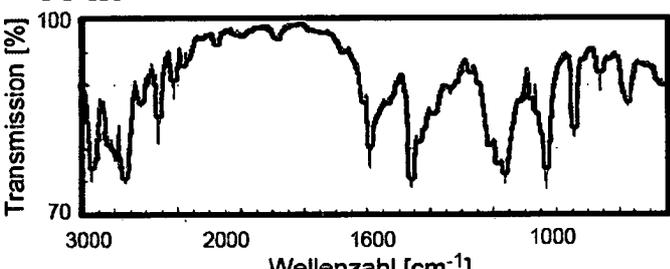
FT-IR



Figur 4

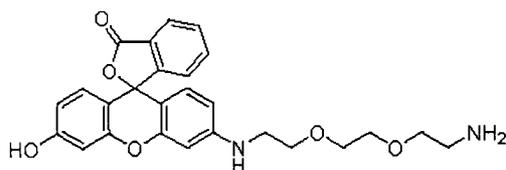
Synthese:
3'-Piperidinyl-rhodol



Durchführung	Methode C
Ansatz	Fluorescein: 1 g (3,0 mmol) Methansulfonsäurechlorid 232 μ L (2,7 mmol) Piperidin 1,8 mL (18,0 mmol)
Reinigung:	Säulenchromatographische Aufreinigung (Flash) über Kieselgel Stufengradient Dichlormethan/Methanol (9:1, 5:1, 1:1).
Ausbeute: Charakterisierung	80 % UV-VIS Absorption, Fluoreszenzemission, Fluoreszenzanregung, $^1\text{H-NMR}$, FT-IR
Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung bei 503 nm	Anregungsspektrum für Fluoreszenzemission bei 534 nm
	
$^1\text{H-NMR}$ (D ₄ -Methanol)	UV- Absorptionsspektrum
	
FT-IR	
	

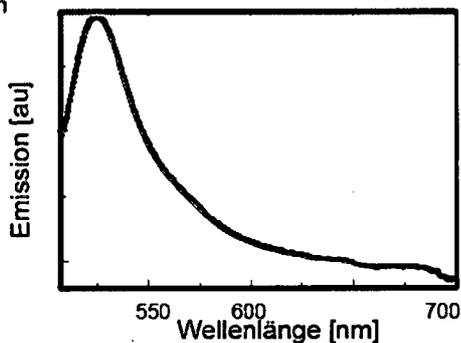
Figur 5

Rhodol-3'-jeffamin-148



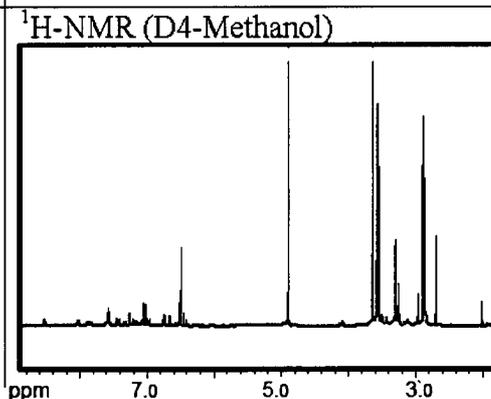
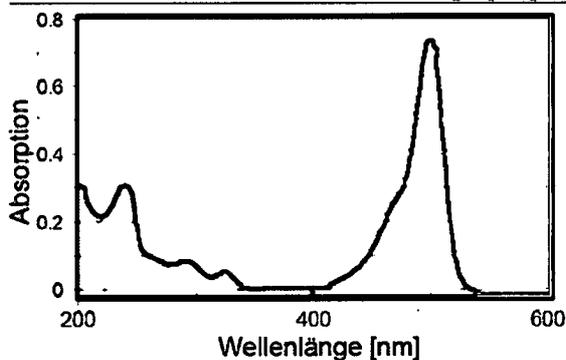
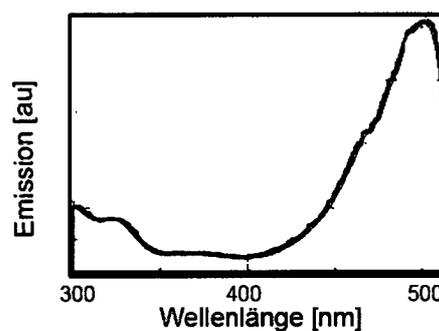
Durchführung:	Methode C
Ansatz	Fluorescein: 0,5g (1,5 mmol) Methansulfonsäurechlorid 100 μ L (1,35 mmol) Jeffamine 148 (CAS Nr 929-59-9) 268 mg (1,8 mmol)
Reinigung:	Säulenchromatographische (Flash) Kieselgel Stufengradient Dichlormethan/Methanol (9:1, 5:1, 1:1).
Ausbeute:	70 %
Charakterisierung	UV-VIS Absorption, Fluoreszenzemission, Fluoreszenzanregung, $^1\text{H-NMR}$

Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung bei 498 nm

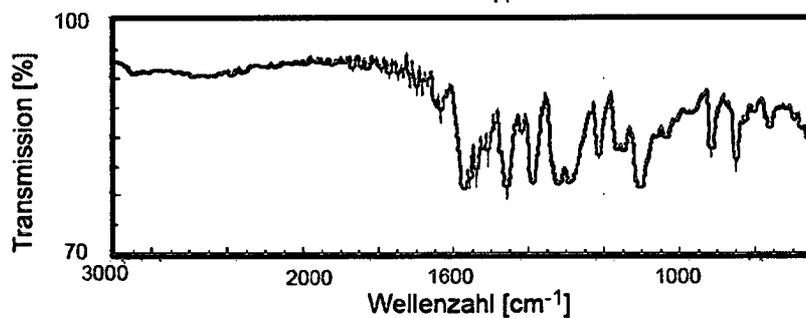


UV-VIS Absorption, Fluoreszenzemission,
Fluoreszenzanregung, $^1\text{H-NMR}$

Anregungsspektrum für Fluoreszenzemission bei 523 nm

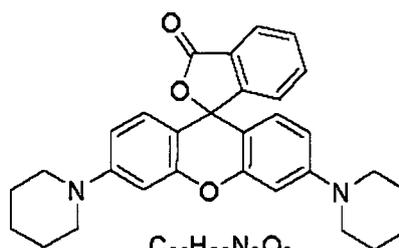


FT-IR



Figur 6

Synthese:
3',6'-Di-Piperidinylrhodamin



$C_{30}H_{30}N_2O_3$
Exact Mass: 466.2256
Mol. Wt.: 466.5708

Durchführung:

Methode D

Ansatz

Fluorescein: 0,5 g (1,5 mmol)
Methansulfonsäurechlorid 700 mg (6 mmol)
Piperidin 1,5 mL (15 mmol)

Reinigung:

Säulenchromatographische (Flash)
Kieselgel
Stufengradient Dichlormethan/Methanol
(9:1, 5:1, 1:1).

Ausbeute:

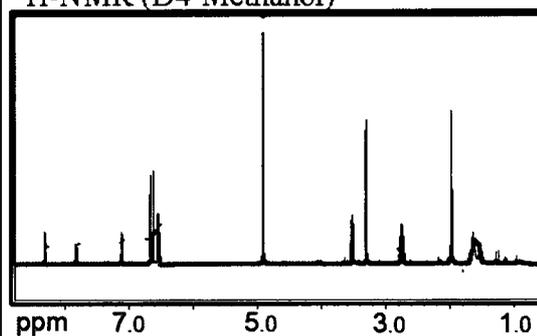
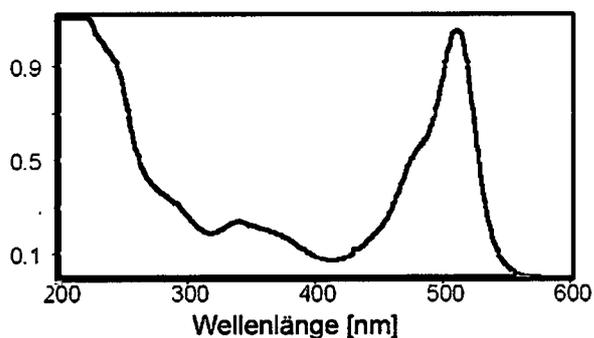
70 %

Charakterisierung

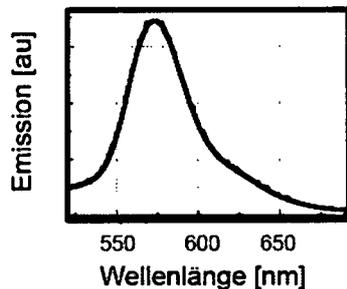
UV-VIS Absorption, Fluoreszenzemission,
Fluoreszenzanregung, 1H -NMR, FT-IR

UV-VIS Absorption

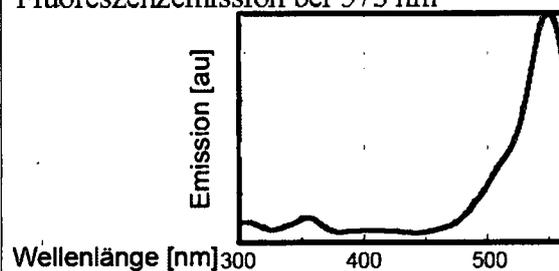
1H -NMR (D4-Methanol)



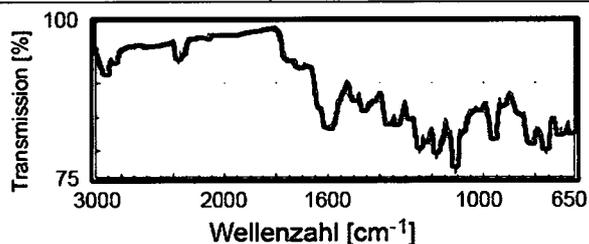
Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung bei
512 nm



Anregungsspektrum für
Fluoreszenzemission bei 573 nm

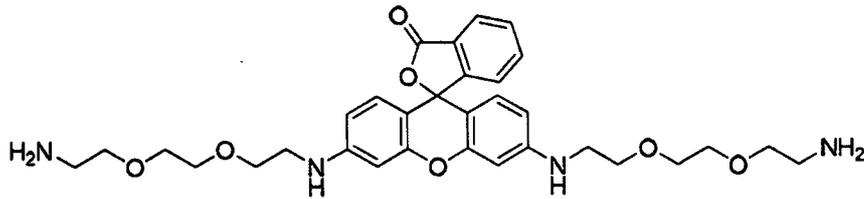


FT-IR



Figur 7

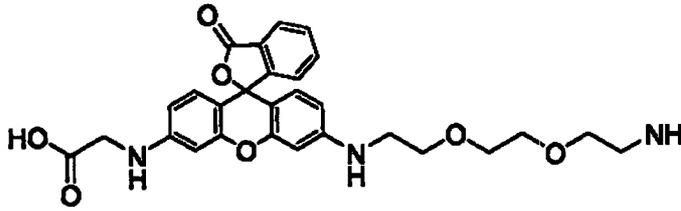
Synthese von 3'6'-bis(jeffamin 154)-rhodamin



Durchführung:	Methode D
Ansatz	
Reinigung:	Präparative TLC Kiesegel Gradientenelution Dichlormethan/Methanol (9:1, 5:1, 1:1).
Ausbeute: Charakterisierung	n.d. UV-VIS Absorption, Fluoreszenzemission, Fluoreszenzanregung, ¹ H-NMR, FT-IR
UV-Absorptionsspektrum	¹ H-NMR (D6-DMSO)
Anregungsspektrum für Fluoreszenzemission bei 545nm	Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung bei 530 nm
FT-IR	

Figur 8

Synthese von 3-glycin-6'-(jeffamin 154)-rhodamin

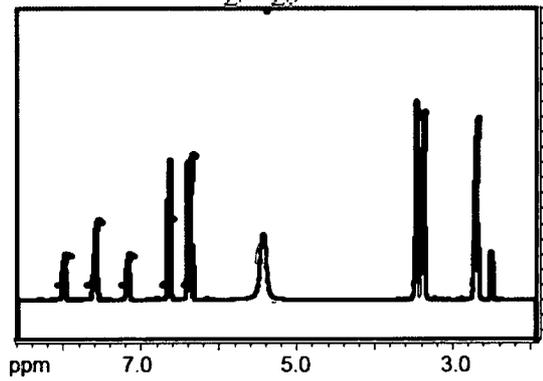
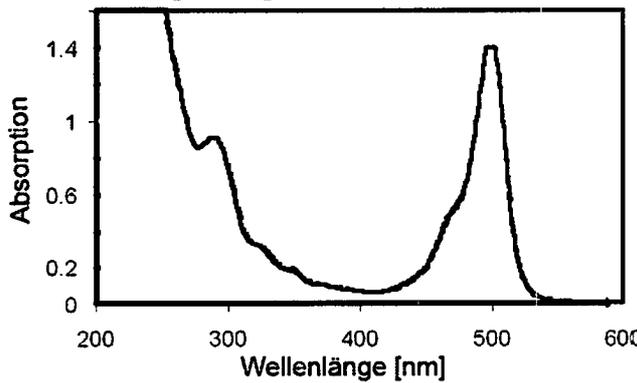


Chemical Formula: C₂₈H₃₂N₄O₆
 Exact Mass: 519.20

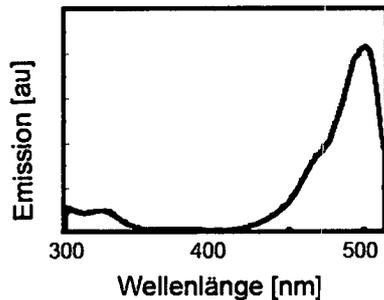
Durchführung: Methode E
 Ansatz: Fluorescein: 0,5 g (1,5 mmol)
 Methansulfonsäurechlorid 350 µL (4,5 mmol)
 Glycin 112 mg (1,5 mmol)
 Jeffamine 148 (CAS Nr 929-59-9) 560 mg (3,75 mmol)
 Reinigung: Säulenchromatographie an Kieselgel mit
 Dichlormethan/Methanol (9:1, 5:1, 1:1).

Ausbeute: 20%
 Charakterisierung: UV-VIS Absorption, Fluoreszenzemission,
 Fluoreszenzanregung, ¹H-NMR

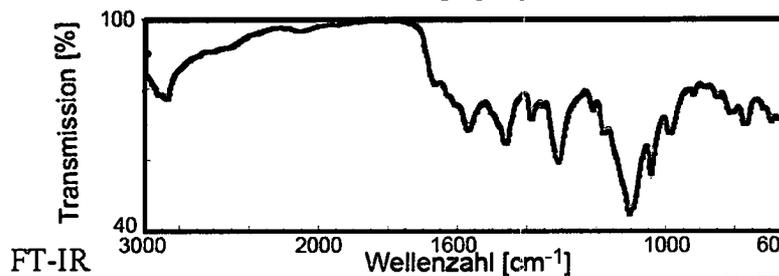
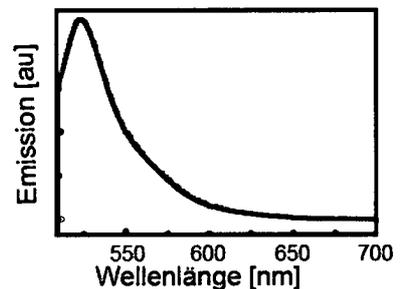
UV-Absorptionsspektrum



Anregungsspektrum für Fluoreszenzemission bei 524 nm

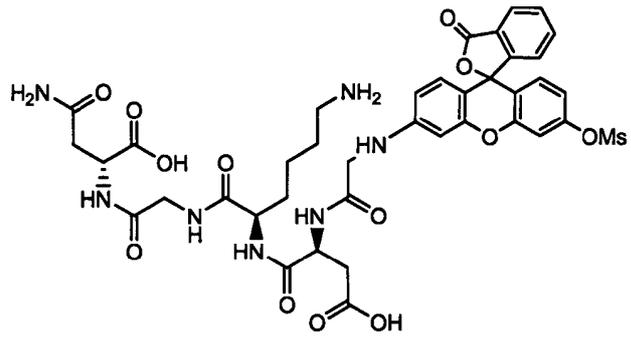


Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung bei 499 nm



Figur 9

Synthese von
3'-(pentapeptidyl)-6'-mesyl-rhodol



NH₂-Asp-Lys-Gly-Asp-Gly-FL-Ms

Chemical Formula: C₃₉H₄₃N₇O₁₅S
Exact Mass: 881.25

Durchführung:
Ansatz

Reinigung:
Ausbeute:

Charakterisierung

Methode F

Rink-AM Harz 175 mg (100 µmol)

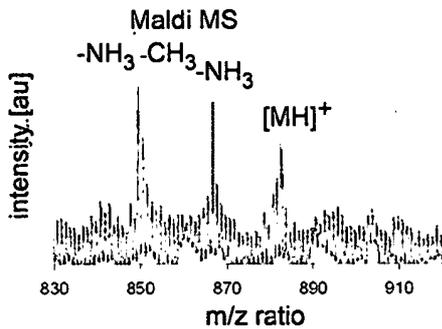
Dimesylfluorescein 500 mg (1 mmol) aus Beispiel 2

Präparative DC

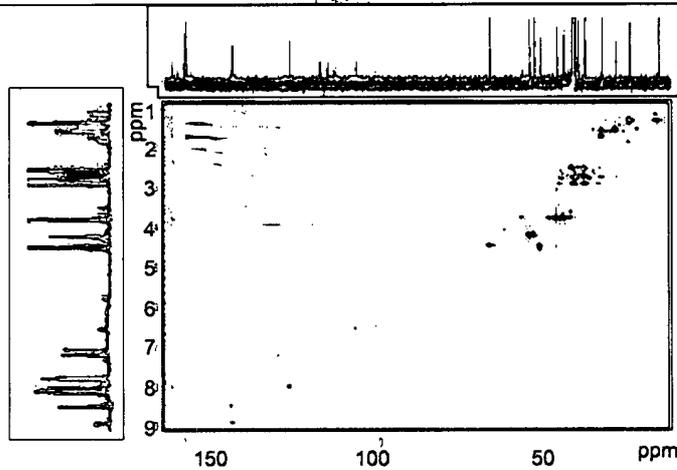
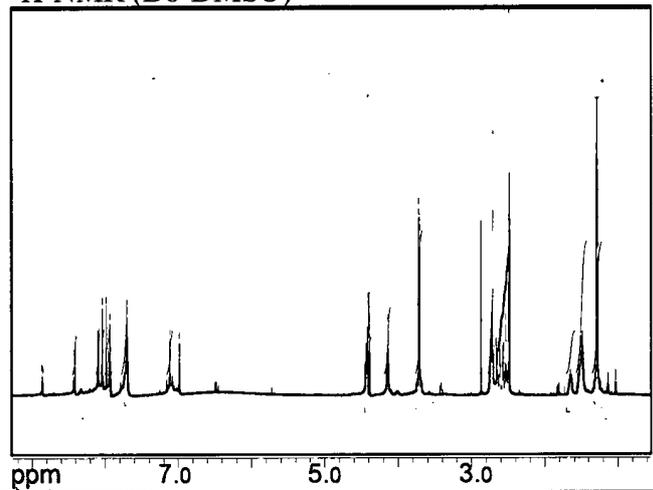
20% (bezogen auf Rink-AM Harz)

MALDI-TOF, ¹H-NMR, CH-COSY-NMR

MALDI: 882 [MH]⁺



¹H-NMR (D₆-DMSO)



CH-COSY-NMR

Figur 10