



(10) **DE 697 31 179 T3** 2012.02.09

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 853 647 B2**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 179.1**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/06090**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 92 2299.9**  
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/039064**  
(86) PCT-Anmeldetag: **11.04.1997**  
(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **23.10.1997**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.07.1998**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **13.10.2004**  
(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **15.06.2011**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.02.2012**

(51) Int Cl.: **C09B 11/00** (2011.01)  
**C09B 11/24** (2011.01)  
**G01N 1/30** (2011.01)  
**C07C 209/36** (2011.01)  
**C07C 245/20** (2011.01)  
**C07C 37/00** (2011.01)

**Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert**

(30) Unionspriorität:  
**631202**                      **12.04.1996**      **US**

(73) Patentinhaber:  
**Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., US**

(74) Vertreter:  
**Kehl & Ettmayr, Patentanwälte, 81679, München, DE**

(84) Benannte Vertragsanstalten:  
**AT, BE, CH, DE, FR, GB, LI, NL**

(72) Erfinder:  
**GEE, Kyle, R., Springfield, US; POOT, Martin, Seattle, US; KLAUBERT, Dieter, H., Eugen, US; SUN, Wei-Chuan, Eugene, US; HAUGLAND, Richard, P., Eugene, US; MAO, Fei, Eugene, US**

(54) Bezeichnung: **FLUORIERTE XANTHENDERIVATE**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

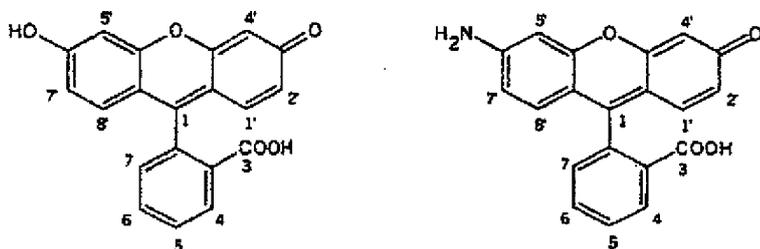
## TECHNISCHES FACHGEBIET DER ERFINDUNG

**[0001]** Die Erfindung betrifft neue fluorierte Fluoresceinfarbstoffe, Reaktivfarbstoffderivate, Farbstoffkonjugate und Farbstoffe, die Enzymsubstrate sind; sowie deren Verwendung.

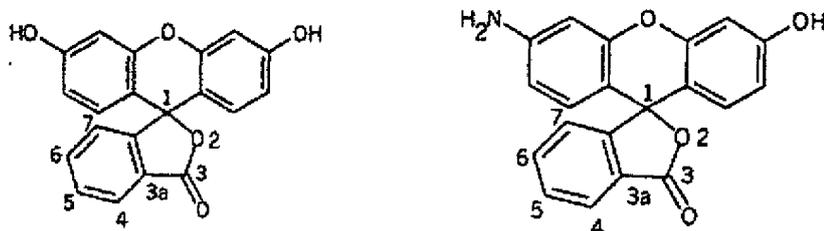
## STAND DER TECHNIK

**[0002]** Fluoreszente Farbstoffe sind bekannt dafür, besonders für biologische Anwendungen geeignet zu sein, bei denen ein hochempfindliches Nachweisreagens erwünscht ist. Fluoreszente Farbstoffe werden benutzt, um anderen Materialien sowohl eine sichtbare Farbe als auch Fluoreszenz zu verleihen. Die Farbstoffe dieser Erfindung sind fluorsubstituierte Analoge von xanthenbasierten Farbstoffen, die typischerweise Fluoresceinderivate sind.

**[0003]** Zu den „Fluorescein“-Farbstoffen gehören Derivate von 3H-Xanthen-6-ol-3-on, die an der 9-Position mit einer 2-Carboxyphenylgruppe substituiert werden, während zu den „Rhodolfarbstoffen“ Derivate von 6-Amino-3H-xanthen-3-on gehören, die an der 9-Position durch eine 2-Carboxyphenylgruppe substituiert werden.



**[0004]** Rhodole und Fluoresceine sind typischerweise an der 1-Position mit einem Derivat substituiert, das einen 5- oder 6-gliedrigen Lacton- oder Lactamring bilden kann:



**[0005]** Die US-A-4318846 beschreibt symmetrisch mit Diether substituierte Fluoresceine und hält fest, dass bestimmte Substituenten Halogen oder Fluor sein können. Die Herstellung von fluorierten Fluoresceinen wird nicht beschrieben.

**[0006]** Die WO 94/05688 und die WO 91/07507 betreffen Fluoresceinfarbstoffe, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie 4,7-dichloro-substituiert sind. Während Fluor als ein Substituent erwähnt wird, wird die Herstellung von fluorierten Fluoresceinen erneut nicht beschrieben.

**[0007]** Die US-A-4997928 lehrt, dass nukleosidhaltige Reagentien ein Reportermolekül enthalten können, das eine 4,7-disubstituierte Fluoresceinverbindung ist. Fluor ist in der Liste der Substituenten enthalten, jedoch wird die Herstellung von fluorierten Fluoresceinen ein weiteres Mal nicht beschrieben.

**[0008]** Die US-A-5451343 offenbart in ähnlicher Weise fluorsubstituierte Fluoron- und Pyronin-Y-Derivate, aber nicht deren Herstellung.

**[0009]** Durrani et al., J. Chem. Soc. Trans. 1, 1980, 1658–1666 offenbart die Synthese von Orsellinsäurederivaten, wobei 5-Fluorresorcin als ein Zwischenprodukt benutzt wird.

**[0010]** Patrick et al., J. Org. Chem. 51, 3242 (1986) lehrt, dass Resorcine unter Verwendung von CsSO<sub>4</sub>F fluoriert werden können; eine gefährliche Verbindung, mit der vorsichtig umgegangen werden muss.

**[0011]** Trotz der bekannten Tendenz von Halogenierung, die Wellenlänge von Fluoresceinen zu verschieben, behalten neue fluorierte Fluoresceine die günstigen Eigenschaften von Fluorescein, einschließlich hoher Absorption und Fluoreszenz, der Anregung bei 488 nm (z. B. Argonlaser) und der Kompatibilität mit standardmäßigen Mikroskopfiltern, bei gezeigten Vorteilen über Fluorescein, einschließlich größerer Lichtstabilität und einem bedeutend geringeren  $pK_s$  ( $> 1,5$  pH-Einheiten gegenüber den ansonsten unsubstituierten Farbstoffen, siehe **Fig. 3**). Die verbesserten Eigenschaften der fluorierten Farbstoffe sind in ihren Konjugaten erhalten, und die Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes auf Konjugaten ist verringert (z. B. **Fig. 1**). Die neuen Materialien sind zur Verwendung in bekannten Anwendungen von Fluoresceinen geeignet, ausgenommen denjenigen, die Empfindlichkeit bezüglich pH-Änderungen in der Nähe von pH 7 erfordern. Zudem stellt die Polyfluorierung des Phenylsubstituenten, der in den meisten Fluorescein-(und Rhodol-)farbstoffen vorhanden ist, einen neuen Weg zu reaktionsfähigen Derivaten und Konjugaten dar. Bestimmte fluorierte Xanthere werden in Zellen unerwartet gut erhalten.

**[0012]** Die einzigartige Chemie des Fluors ist mit den Verfahren, die typischerweise benutzt werden, um chlor-, brom- oder iodsubstituierte Fluoresceinderivate herzustellen, inkompatibel, und es sind bisher keine effizienten Verfahren zum Herstellen von Fluorescein- und Fluoramino-phenol-Zwischenprodukten beschrieben worden. Es wird außerdem ein neues Mittel zum Herstellen von 1'- und/oder 8'-substituierten Xanthenen beschrieben.

#### BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

**[0013]** **Fig. 1:** Fluoreszenz gegen den Substitutionsgrad für Farbstoffkonjugate von Anti-Maus-Immunglobulin von Ziegen G (GAM IgG). Die Fluoreszenz wird durch Messen der Quantenausbeute des Farbstoffkonjugats im Verhältnis zum freien Farbstoff und Multiplizieren mit der Anzahl der Fluorophore pro Protein bestimmt: Verbindung 109 (▲) Verbindung 64 (■), Verbindung 61 (•) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC, □).

**[0014]** **Fig. 2:** Relative Lichtstabilität von Farbstoffkonjugaten von GAM IgG. Die Konjugate von fluorierten Farbstoffen zeigen im Verhältnis zu nichtfluorierten Farbstoffen eine erhöhte Lichtstabilität: Verbindung 59 (■), Verbindung 109 (▲) Verbindung 35 (□) und 6-Carboxyfluorescein (•).

**[0015]** **Fig. 3:** Die Auswirkung der Fluorierung auf die pH-abhängige Fluoreszenz: Verbindung 35 (•) und 6-Carboxyfluorescein (o) (Anregung/Emission bei 490/520 nm).

**[0016]** **Fig. 4:** Die relative Lichtstabilität von Phalloidinkonjugaten von 6-Carboxymethylthio-2',4,5,7,7'-pentafluorfluorescein (■) und 6-Carboxyfluorescein (•).

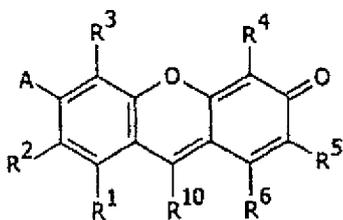
**[0017]** **Fig. 5:** Erhaltung der Fluoreszenz in Zellen, die mit 1) Fluoresceindiacetat (FDA) und 2) Verbindung 26 behandelt wurden.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG UND BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0018]** Die Erfindung stellt neue Xanthenfarbstoffe bereit.

**[0019]** Bei der Beschreibung der Farbstoffe bedeutet Carboxy -COOH, ein biologisch kompatibles Salz einer Carbonsäure oder einen biologisch kompatiblen Ester einer Carbonsäure; Sulfo bedeutet -SO<sub>3</sub>H oder ein biologisch kompatibles Salz einer Sulfonsäure. Ein biologisch kompatibles Salz bezeichnet ein Salz, das für biologische Systeme nicht schädlich ist, einschließlich K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und NR<sub>4</sub><sup>+</sup>-Salzen, wobei R = H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl oder C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkanol oder Kombinationen davon ist. Ein biologisch kompatibler Ester bezeichnet einen leicht hydrolysierbaren Ester, der in biologischen Systemen verwendet wird, z. B.  $\alpha$ -Acyloxyalkylester (typischerweise -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup>, wobei R<sup>18</sup> C<sub>1-4</sub>-Alkyl ist, insbesondere Acetoxymethyl(CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-Ester).

**[0020]** Die Farbstoffe haben die Formel



Formel I

wobei  $R^1$ - $R^6$ ,  $R^{10}$  und A wie in den Patentansprüchen definiert sind.

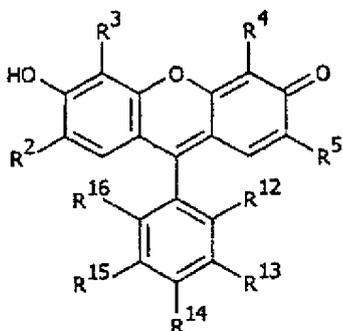
**[0021]** Wo A OR<sup>7</sup> ist,  $R^{10}$  Aryl ist und  $R^{12}$  Carboxy ist, ist der beschriebene Farbstoff ein Fluorescein.

**[0022]** Die fluorierten Xanthere der Erfindung besitzen optional eine reaktionsfähige Gruppe, die mittels einer Einfachbindung oder einer Verknüpfungsgruppierung an das Fluorophor gebunden ist, und können verwendet werden, um ein Farbstoffkonjugat herzustellen. Die Farbstoffe enthalten optional einen  $R^7$ -Substituenten, der den Farbstoff photoaktivierbar oder eindringfähiger in die Zellen macht oder den Farbstoff zu einem Substrat für ein Enzym macht oder seine spektralen Eigenschaften modifiziert.

**[0023]** In einer Ausführungsform ist eines oder mehrere von  $R^1$  und  $R^6$  F. In einer zusätzlichen Ausführungsform ist keines von  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  F. In noch einer weiteren Ausführungsform ist mindestens eines von  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  F. Alternativ sind  $R^1$  und  $R^6$  H, und  $R^3$  und  $R^4$  sind H, Cl, Br, I oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxy. In einer weiteren Ausführungsform ist mindestens eines von  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  F. In einer Ausführungsform sind vier von  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  F. In einer weiteren Ausführungsform sind mindestens drei und optional alle von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  F. In noch einer weiteren Ausführungsform ist  $R^{10}$  F.

**[0024]** Wo jedes von  $R^{13}$  bis  $R^{16}$  fluoriert wird, reagieren die erhaltenen Farbstoffe bereitwillig mit Nukleophilen.

**[0025]** Eine bevorzugte Klasse von Farbstoffen hat die Formel



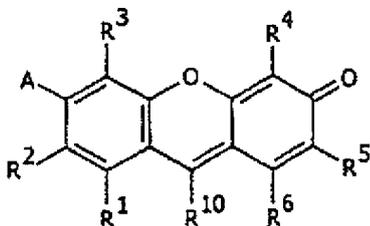
wobei

$R^3$ ,  $R^4$  unabhängig voneinander H sind;

$R^{12}$  eine Carbonsäure, ein Salz einer Carbonsäure, ein Carbonsäureester eines  $C_1$ - $C_6$ -Alkohols, eine Sulfonsäure oder ein Salz einer Sulfonsäure ist;

$R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  unabhängig voneinander H, F, Carbonsäure, ein Salz einer Carbonsäure, ein Carbonsäureester eines  $C_1$ - $C_6$ -Alkohols, ein Carbonsäureester von  $-CH_2-O-(C=O)-R^{18}$ , eine Sulfonsäure, ein Salz einer Sulfonsäure oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkylthio sind, die optional mit Carbonsäure, einem Salz einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester eines  $C_1$ - $C_6$ -Alkohols oder einem Carbonsäureester von  $-CH_2-O-(C=O)-R^{18}$  substituiert sind.

**[0026]** Die Erfindung stellt auch Verbindungen bereit, welche die Formel



haben, wobei

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  und A wie oben definiert sind; und exakt eines von  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^7$  und  $R^{10}$  -L- $S_c$  ist;

wobei L eine kovalente Einfachbindung ist oder L eine kovalente Verknüpfung mit 1 bis 24 Nichtwasserstoffatomen ist, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus C, N, O und S besteht, und aus einer beliebigen Kombination von Einfach-, Doppel-, Dreifach- oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, Stickstoff-Stickstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen und Kohlenstoff-Schwefel-Bindungen zusammengesetzt ist; und

$S_c$  eine konjugierte Substanz ist, die eine Ionenkomplexierende Gruppierung ist.

**[0027]** Weitere Aspekte und Ausführungsformen der Erfindung sind wie in den Patentansprüchen ausgeführt.

**[0028]** Bevorzugte Farbstoffe haben in wässriger Lösung ( $\text{pH} = 6$ ) eine Quantenausbeute von größer als 0,50. Vorzugsweise besitzen diese Farbstoffe einen  $\text{pK}_s$  von kleiner als 5,0. Der Extinktionskoeffizient bevorzugter Farbstoffe, gemessen bei einer Wellenlänge von mehr als 490 nm bei  $\text{pH} 6,0$ , ist größer als  $60.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Vorzugsweise zeigen die fluorierten Farbstoffe ein Fluoreszenzemissionsmaximum, das im Verhältnis zu jenem des nichtfluorierten Analogons um weniger als 15 nm verschoben ist. Die spektralen Eigenschaften ausgewählter Farbstoffe sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Spektrale Eigenschaften ausgewählter fluoriertester Fluoresceine und Rhodole

Farbstoff	$\epsilon \times 10^{-3}$ ( $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	Abs. (nm)	Em. (nm)	Quanten- ausbeute	Licht- zersetzung*	pK <sub>s</sub>
Fluorescein I	82,2	490	514	0,92	17	6,5
2',7'-Difluorfluorescein (29)	84,7	490	513	0,97	8,0	4,7
4,5,6,7-Tetrafluorfluorescein (34) †	85,6	508	527	0,85	6,6	6,1
2',4,5,6,7,7'-Hexafluorfluorescein (26)	81,2	508	527	0,96	4,0	4,8
5-(und-6)-Carboxyfluorescein †	82,0	492	516	0,92	17	6,4
5-(und-6)-Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein †	80,3	504	530	0,75	---	---
5-(und-6)-Carboxy-2',7'-difluorfluorescein (35, 36)	85,9	492	516	0,92	9,0	4,8
5-(und-6)-Carboxy-4',5'-difluorfluorescein (41)	84,2	510	534	0,43	11	5,2
5-(und-6)-Carboxy-2',4',5',7',7'-tetrafluorfluorescein (40)	81,3	510	533	0,59	6,0	3,7
2',7'-Dichlorfluorescein †	---	---	---	---	---	5,1
2',7'-Dichlor-4,5,6,7-tetrafluorfluorescein (37) †	88,5	520	538	0,80	3,0	4,2
6-Carboxymethylthio-4,5,7-trifluorfluorescein (58) †	63,5	507	526	0,88	5,0	4,5
6-Carboxymethylthio-2',4,5,7,7'-pentafluorfluorescein (59)	87,5	507	526	0,86	---	---
1,2,4,5,7,8-Hexafluor-6-hydroxy-9-pentafluorphenyl-3H-xanthen-3-on (50)	---	---	---	0,11	4,0	2,8

\* reduzierte Intensität des Fluoresceins in % nach 33 Minuten Belichtung im Fluorometer bei einer Wellenlänge maximaler Anregung.

† komparativer Farbstoff

## Konjugate von Reaktivfarbstoffen

**[0029]** Eine Ausführungsform des fluorierten Fluorophors enthält mindestens eine  $-L-R_x$ -Gruppe, wobei  $R_x$  die reaktionsfähige Gruppe ist, die durch eine kovalente Verknüpfung L an das Fluorophor gebunden ist. In bestimmten Ausführungsformen (siehe Tabelle 9) ist  $R_x$  über mehrere dazwischenliegende Atome, die als ein Abstandhalter dienen, an den Farbstoff gebunden. Die Farbstoffe mit einer reaktionsfähigen Gruppe ( $R_x$ ) markieren eine breite Vielfalt an organischen oder anorganischen Substanzen mit Fluoreszenz, die funktionelle Gruppen mit geeigneter Reaktionsfähigkeit enthalten oder so modifiziert wurden, dass sie diese enthalten, was zur chemischen Anbindung der konjugierten Substanz ( $S_c$ ) führt und durch  $-L-S_c$  dargestellt ist. Die reaktionsfähige Gruppe und die funktionelle Gruppe sind typischerweise ein Elektrophil und ein Nukleophil, die eine kovalente Verknüpfung bilden können. Alternativ ist die reaktionsfähige Gruppe eine photoaktivierbare Gruppe und wird erst nach Belichtung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge chemisch reaktionsfähig. Ausgewählte Beispiele für funktionelle Gruppen und Verknüpfungen sind in Tabelle 2 dargestellt, wobei die Reaktion einer elektrophilen Gruppe und einer nukleophilen Gruppe eine kovalente Verknüpfung ergibt.

Tabelle 2: Beispiele für einige Wege zu nützlichen kovalenten Verknüpfungen

Elektrophile Gruppe	Nukleophile Gruppe	Resultierende kovalente Verknüpfung
aktivierte Ester*	Amine/Aniline	Carboxamide
Acylazide	Amine/Aniline	Carboxamide
Acylhalogenide	Amine/Aniline	Carboxamide
Acylhalogenide	Alkohole/Phenole	Ester
Acylnitrile	Alkohole/Phenole	Ester
Acylnitrile	Amine/Aniline	Carboxamide
Aldehyde	Amine/Aniline	Imine
Aldehyde oder Ketone	Hydrazine	Hydrazone
Aldehyde oder Ketone	Hydroxylamine	Oxime
Alkylhalogenide	Amine/Aniline	Alkylamide
Alkylhalogenide	Carbonsäuren	Ester
Alkylhalogenide	Thiole	Thioether
Alkylhalogenide	Alkohole/Phenole	Ether
Alkylsulfonate	Thiole	Thioether
Alkylsulfonate	Carbonsäuren	Ester
Alkylsulfonate	Alkohole/Phenole	Ether
Anhydride	Alkohole/Phenole	Ester
Anhydride	Amine/Aniline	Carboxamide
Arylhalogenide	Thiole	Thiophenole
Arylhalogenide	Amine	Arylamine
Aziridine	Thiole	Thioether
Boronate	Glycole	Boronatester
Carbonsäuren	Amine/Aniline	Carboxamide
Carbonsäuren	Alkohole	Ester
Carbonsäuren	Hydrazine	Hydrazine
Carbodiimide	Carbonsäuren	N-Acylurea oder -Anhydride
Diazoalkane	Carbonsäuren	Ester
Epoxide	Thiole	Thioether

Haloacetamide	Thiole	Thioether
Halotriazine	Amine/Aniline	Aminotriazine
Halotriazine	Alkohole/Phenole	Trianzinylether
Imidoester	Amine/Aniline	Amidine
Isocyanate	Amine/Aniline	Urea
Isocyanate	Alkohole/Phenole	Urethane
Isothiocyanate	Amine/Aniline	Thiourea
Maleimide	Thiole	Thioether
Phosphoramidite	Alkohole	Phosphitester
Silylhalogenide	Alkohole	Silylether
Sulfonatester	Amine/Aniline	Alkylamine
Sulfonatester	Thiole	Thioether
Sulfonatester	Carbonsäuren	Ester
Sulfonatester	Alkohole	Ether
Sulfonylhalogenide	Amine/Aniline	Sulfonamide
Sulfonylhalogenide	Phenole/Alkohole	Sulfonatester

\* Aktivierte Ester, wie im Fachgebiet aufgefasst, weisen im Allgemeinen die Formel  $-CO\Omega$  auf, wobei  $\Omega$  eine gute Abgangsgruppe ist (z. B. Oxysuccinimidyl ( $-OC_4H_4O_2$ ), Oxysulfosuccinimidyl ( $-OC_4H_3O_2-SO_3H$ ), -1-Oxybenzotriazolyl ( $-OC_6H_4N_3$ ), oder eine Aryloxygruppe oder Aryloxy, das mit elektronenabziehenden Substituenten, wie z. B. Nitro, Fluor, Chlor, Cyano oder Trifluormethyl oder Kombinationen davon, einfach oder mehrfach substituiert ist, die benutzt werden, um aktivierte Arylester zu bilden, oder eine Carbonsäure, die durch ein Carbodiimid aktiviert ist, um ein Anhydrid oder ein gemischtes Anhydrid  $-OCOR^a$  oder  $-OCN^aNHR^b$  zu bilden, wobei  $R^a$  und  $R^b$ , die gleich oder verschieden sein können,  $C_1-C_4$ -Alkyl,  $C_1-C_6$ -Perfluoralkyl oder  $C_1-C_6$ -Alkoxy oder Cyclohexyl, 3-Dimethylaminopropyl oder N-Morpholinoethyl sind).

\*\* Acylazide können sich auch zu Isocyanaten umlagern. Die kovalente Verknüpfung L bindet die reaktionsfähige Gruppe  $R_x$  oder die konjugierte Substanz  $S_c$  an das Fluorophor, entweder direkt (L ist eine Einfachbindung) oder mit einer Kombination stabiler chemischer Bindungen, die optional Einfach-, Doppel-, Dreifach- oder aromatische Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen sowie Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, Stickstoff-Stickstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen und Kohlenstoff-Schwefel-Bindungen enthalten. L schließt typischerweise Ether-, Thioether-, Carboxamid-, Sulfonamid-, Urea-, Urethan- oder Hydrazingruppierungen ein. Bevorzugte L-Gruppierungen weisen 1 bis 20 Nichtwasserstoffatome auf, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus C, N, O und S besteht, und sind aus einer beliebigen Kombination von Ether-, Thioether-, Amin-, Ester-, Carboxamid-, Sulfonamid-, Hydrazidbindungen und aromatischen oder heteroaromatischen Bindungen zusammengesetzt. L ist vorzugsweise eine Kombination von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindungen und Carboxamid- oder Thioetherbindungen. Der längste lineare Abschnitt der Verknüpfung L enthält vorzugsweise 4 bis 10 Nichtwasserstoffatome, einschließlich ein oder zwei Heteroatome. Beispiele für L sind substituiertes oder unsubstituiertes Polymethylen, Arylen, Alkylarylen oder Arylenalkyl. In einer Ausführungsform enthält L 1 bis 6 Kohlenstoffatome; in einer weiteren ist L eine Thioetherverknüpfung. In noch einer weiteren Ausführungsform hat L die Formel  $-(CH_2)_a(CONH(CH_2)_b)_z-$ , wobei a einen beliebigen Wert von 0 bis 5, b einen beliebigen Wert von 1 bis 5 aufweist und z 0 oder 1 ist.

**[0030]** Die Gruppe  $R_x$  ist an einem beliebigen von  $R^7$ ,  $R^{10}$  oder  $R^{12}-R^{16}$ , vorzugsweise an einem von  $R^{13}-R^{16}$ , mehr bevorzugt an  $R^{14}$  oder  $R^{15}$ , direkt an das Fluorophor gebunden oder ist als ein Substituent an einem Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Alkylaminosubstituenten vorhanden. In einer Ausführungsform ist exakt eines von  $R^7$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  oder  $R^{16}$  eine  $-L-S_c$ -Gruppierung. In einer weiteren Ausführungsform ist exakt eines von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  oder  $R^{16}$  eine  $-L-S_c$ -Gruppierung. Wo exakt eines von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  oder  $R^{16}$  eine  $-L-S_c$ -Gruppierung ist, ist typischerweise entweder jedes der übrigen von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  oder  $R^{16}$  Fluor oder jedes der übrigen von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  oder  $R^{16}$  Wasserstoff. In einer Ausführungsform ist exakt eines von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  eine  $-L-R_x$ -Gruppierung. In einer weiteren Ausführungsform ist exakt eines von  $R^7$  oder  $R^{10}$  eine  $-L-R_x$ -Gruppierung. In einer weiteren Ausführungsform, in der  $R^{12}$  eine Carbonsäure oder eine Sulfonsäure ist, ist in dem fluorierten Farbstoff eine zusätzliche  $-L-R_x$ -Gruppierung vorhanden.

**[0031]** Die Auswahl der kovalenten Verknüpfung, die das Fluorophor an die konjugierte Substanz binden soll, hängt typischerweise von der funktionellen Gruppe an der zu konjugierenden Substanz ab. Zu den Typen funktioneller Gruppen, die in den organischen oder anorganischen Substanzen typischerweise vorhanden sind, gehören, nicht ausschließlich, Amine, Thiole, Alkohole, Phenole, Aldehyde, Ketone, Phosphate, Imidazole, Hydrazine, Hydroxylamine, disubstituierte Amine, Halogenide, Epoxide, Sulfonatester, Purine, Pyrimidine, Carbonsäuren oder eine Kombination dieser Gruppen. An der Substanz kann ein einziger Typ einer reaktionsfähigen Stelle verfügbar sein (typisch für Polysaccharide) oder eine Vielzahl an Stellen vorkommen (z. B. Amine, Thiole, Alkohole, Phenole), wie es für Proteine typisch ist. Eine konjugierte Substanz kann an mehr als einem Fluorophor, das gleich oder verschieden sein kann, oder an einer Substanz konjugiert sein, die zusätzlich durch ein Hapten modifiziert wird. Obwohl durch sorgfältiges Steuern der Reaktionsbedingungen eine gewisse Selektivität erhalten werden kann, wird die Selektivität des Markierens am besten durch Auswahl eines geeigneten Reaktivfarbstoffes erhalten.

**[0032]**  $R_x$  wird typischerweise mit einem Amin, einem Thiol oder einem Alkohol reagieren. In einer Ausführungsform ist  $R_x$  eine Acrylamidgruppe, eine Gruppe eines aktivierten Esters einer Carbonsäure, eine Acylamid-, eine Acylnitril-, eine Aldehyd-, eine Alkylhalogenid-, eine Amin-, eine Anhydrid-, eine Anilin-, eine Arylhalogenid-, eine Azid-, eine Aziridin-, eine Boronat-, eine Carbonsäure-, eine Diazoalkan-, eine Halogenacetamid-, eine Halogentriazin-, eine Hydrazin-, eine Imidoester-, eine Isocyanat-, eine Isothiocyanat-, eine Maleinimid-, eine Phosphoramidit-, eine Sulfonylhalogenid- oder eine Thiolgruppe.  $R_x$  ist vorzugsweise eine Carbonsäure-, eine Succinimidylerster-, eine Amin-, eine Halogenacetamid-, eine Alkylhalogenid-, eine Sulfonylhalogenid-, eine Isothiocyanat-, eine Maleinimid- oder eine Azidoperfluorbenzamidogruppe.

**[0033]** Die Substitution mit einem Halogenalkyl, Halogenacetamid, Halogenmethylbenzamid ermöglicht die Erhaltung fluorierter Fluorophore in Zellen oder Organellen gemäß den zuvor beschriebenen Verfahren (US-Patente 5,362,628 und 5,576,424 (in Zellen) und US-Patent 5,459,268 und UK 9420661.2 (in Mitochondrien)). Farbstoffe, die an dem Bodenring fluoriert sind, ergeben Addukte von Glutathion (z. B. Verbindung 25) und Protein, die in Zellen zurückgehalten werden.

**[0034]** Zu nützlichen Farbstoffkonjugaten gehören Konjugate von Antigenen, Steroiden, Vitaminen, Arzneimitteln, Haptene, Metaboliten, Toxinen, Umweltschadstoffen, Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Nucleinsäuren, Nucleinsäurepolymeren, Kohlenhydraten, Lipiden, Ionenkomplexierenden Gruppierungen und Polymeren. Alternativ sind diese Konjugate von Zellen, Zellsystemen, Zellfragmenten oder subzellulären Teilchen. Beispiele sind Virusteilchen, Bakterienteilchen, Viruskomponenten, biologische Zellen (wie z. B. Tierzellen, Pflanzenzellen, Bakterien oder Hefe) oder Zellkomponenten. Fluorierte Reaktivfarbstoffe markieren reaktionsfähige Stellen an der Zelloberfläche, in Zellmembranen, Organellen oder im Zytoplasma oder derivatisieren Verbindungen von geringem Molekulargewicht zur Analyse mittels Kapillarzonenlektrophorese, HPLC oder anderer Trenntechniken. Die konjugierte Substanz ist vorzugsweise eine Aminosäure, ein Peptid, ein Protein, ein Polysaccharid, eine Ionenkomplexierende Gruppierung, ein Nucleotid, ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Hapten, ein Arzneimittel, ein Lipid, ein Phospholipid, ein Lipoprotein, ein Lipopolysaccharid, ein Liposom, ein lipophiles Polymer, ein Polymer, ein polymeres Mikroteilchen, eine biologische Zelle oder ein Virus.

**[0035]** In einer Ausführungsform ist die konjugierte Substanz ( $S_c$ ) eine Aminosäure (einschließlich derjenigen, die durch Phosphate, Kohlenhydrate oder  $C_{1-}$  bis  $C_{22}$ -Carbonsäuren geschützt oder damit substituiert sind) oder ein Polymer von Aminosäuren, wie z. B. ein Peptid oder ein Protein. Bevorzugte Konjugate von Peptiden enthalten mindestens fünf Aminosäuren, mehr bevorzugt 5 bis 36 Aminosäuren. Zu den bevorzugten Peptiden gehören, nicht ausschließlich, Neuropeptide, Zytokine, Toxine, Proteasesubstrate und Proteinkinasesubstrate. Zu den bevorzugten Proteinkonjugaten gehören Enzyme, Antikörper, Lectine, Glycoproteine, Histone, Albumine, Lipoproteine, Avidin, Streptavidin, Protein A, Protein G, Phycobiliproteine und andere fluoreszierende Proteine, Hormone, Toxine und Wachstumsfaktoren. Das konjugierte Protein ist typischerweise ein Antikörper, ein Antikörperfragment, Avidin, Streptavidin, ein Toxin, ein Lectin oder ein Wachstumsfaktor. Zu Farbstoff-Peptid- und -Protein-Konjugaten gehören diejenigen, die mit einem Farbstoff der Erfindung in Kombination mit einem zweiten fluoreszierenden oder nichtfluoreszierenden Farbstoff markiert sind, um ein Energieübertragungspaar zu bilden.

**[0036]** In einer weiteren Ausführungsform ist die konjugierte Substanz ( $S_c$ ) eine Nucleinsäurebase, ein Nucleotid, ein Nucleotid oder ein Nucleinsäurepolymer, das optional einen zusätzlichen Verknüpfen oder Abstandhalter für die Anbindung eines Fluorophors oder eines anderen Liganden enthält, wie z. B. eine Alkylverknüpfung (US-Patent 5,047,519), eine Aminoallylverknüpfung (US-Patent 4,711,955) oder eine andere Verknüpfung. Das konjugierte Nucleotid ist vorzugsweise ein Nucleosidtriphosphat oder ein Desoxynucleosidtriphosphat oder ein Didesoxynucleosidtriphosphat.

**[0037]** Bevorzugte Nucleinsäurekonjugate sind markierte, ein- oder mehrsträngige, natürliche oder synthetische DNA- oder RNA-Oligonucleotide oder DNA/RNA-Hybride, oder beinhalten einen ungewöhnlichen Verknüpfer, wie z. B. morpholinderivatisierte Phosphate (AntiVirals, Inc., Corvallis, Oregon, USA), oder Peptidnucleinsäuren, wie z. B. N-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten, wobei die Nucleinsäure weniger als 50 Nucleotide, noch typischer weniger als 25 Nucleotide, enthält. Der Farbstoff ist typischerweise über eine oder mehrere Purin- oder Pyrimidinbasen durch eine Amid-, Ester-, Ether- oder Thioetherbindung gebunden oder an das Phosphat oder Kohlenhydrat durch eine Bindung gebunden, die ein Ester, Thioester, Amid, Ether oder Thioether ist. Alternativ ist mindestens ein Farbstoff der Erfindung an ein Oligonucleotid konjugiert, das gleichzeitig mit mindestens einem zweiten Farbstoff markiert ist, um ein Fluoreszenz-Energieübertragungspaar zu bilden, oder an ein Hapten, wie z. B. Biotin oder Digoxigenin, oder an ein Enzym, wie z. B. alkalische Phosphatase, oder an ein Protein, wie z. B. einen Antikörper. Nucleotidkonjugate der Erfindung lassen sich von DNA-Polymerase leicht einbeziehen und können zur In-situ-Hybridisierung (siehe unten) und Nucleinsäuresequenzierung (z. B. US-Patente 5,332,666; 5,171,534 und 4,997,928 und WO-Anmeldung 94/05688) verwendet werden.

**[0038]** In einer weiteren Ausführungsform ist die konjugierte Substanz ( $S_c$ ) ein Kohlenhydrat, das typischerweise ein Polysaccharid, wie z. B. Dextran, FICOL, Heparin, Glycogen, Amylopectin, Mannan, Inulin, Stärke, Agarose und Cellulose, ist. Bevorzugte Polysaccharidkonjugate sind Dextran- oder FICOL-Konjugate.

**[0039]** In einer weiteren Ausführungsform ist die konjugierte Substanz ( $S_c$ ) ein Lipid (typischerweise mit 6 bis 25 Kohlenstoffatomen), einschließlich Glycolipiden, Phospholipiden und Sphingolipiden. Alternativ ist die konjugierte Substanz ein Lipidvesikel, wie z. B. ein Liposom, oder ein Lipoprotein (siehe unten). Die lipophile Gruppierung kann verwendet werden, um die Verbindungen in Zellen zurückzuhalten, wie in US-Patent 5,208,148 beschrieben.

**[0040]** Konjugate, die eine Ionenkomplexierende Gruppierung aufweisen, dienen als ein Indikator für Calcium, Natrium, Magnesium, Kalium oder ein anderes biologisch wichtiges Metallion. Bevorzugte Ionenkomplexierende Gruppierungen sind Kronenether, einschließlich Diaryldiaza-Kronenether (US-Patent 5,405,975), BAPTA (US-Patent 5,453,517, US-Patent 5,516,911 und US-Patent 5,049,673), Derivate APTRA (AM. J. PHYSIOL. 256, C540 (1989)) und pyridin- und phenanthrolinbasierte Metallionenchelatbildner, vorzugsweise ein Diaryldiaza-Kronenether- oder ein BAPTA-Chelatbildner. Die Ionenindikatoren werden optional an Kunststoff- oder biologische Polymere, wie z. B. Dextrane, konjugiert, um deren Nützlichkeit als Sensoren zu verbessern. Alternativ wirkt der Farbstoff bei pH-Werten innerhalb von 1,5 pH-Einheiten des jeweiligen  $pK_s$  des Farbstoffs selbst als ein Indikator für  $H^+$ . Diejenigen Ausführungsformen von Farbstoffen, die an  $R^2$  und  $R^5$  Fluor aufweisen, sind im Bereich von pH 4 bis 6 die nützlichsten pH-Indikatoren.

**[0041]** Schließlich sind die Konjugate optional Farbstoffkonjugate von Polymeren, polymeren Teilchen, polymeren Mikroteilchen, einschließlich magnetischen und nichtmagnetischen Mikrokügelchen, polymeren Membranen, leitfähigen und nichtleitfähigen Metallen und Nichtmetallen und Glas- und Kunststoffoberflächen und -teilchen. Konjugate werden optional durch Copolymerisation eines fluorierten Farbstoffes, der eine geeignete Funktionalität enthält, während des Herstellens des Polymers oder durch chemische Modifizierung eines Polymers, das funktionelle Gruppen mit geeigneter chemischer Reaktivität enthält, hergestellt. Zu anderen Reaktionstypen, die zum Herstellen von Farbstoffkonjugaten von Polymeren nützlich sind, gehören katalysierte Polymerisationen oder Copolymerisationen von Alkenen und Reaktionen von Dienen mit Dienophilen, Umessterungen oder Umaminierungen. In einer weiteren Ausführungsform ist die konjugierte Substanz ein Glas oder Silica, das zu einer optischen Faser oder einer anderen Struktur gebildet werden kann.

**[0042]** Die Herstellung von Farbstoffkonjugaten unter Verwendung von Reaktivfarbstoffen ist gut dokumentiert, z. B. von R. Haugland, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Handbuch molekularer Sonden zu fluoreszierenden Sonden und Forschungschemikalien), Serie 1 bis 7 (1992) und Brinkley, BIOCONJUGATE CHEM. 3,2 (1992). Konjugate werden typischerweise aus dem Vermischen geeigneter fluorierter Reaktivfarbstoffe und der zu konjugierenden Substanz in einem geeigneten Lösemittel, in dem beide löslich sind, erhalten. Für diejenigen Reaktivfarbstoffe, die photoaktiviert werden, erfordert die Konjugation die Belichtung der Reaktionsmischung, um den Reaktivfarbstoff zu aktivieren. Das Farbstoff-Biomolekül-Konjugat wird in Lösung oder lyophilisiert verwendet.

**[0043]** Markierte Glieder eines spezifischen Bindungspaares werden als fluoreszierende Sonden für das komplementäre Glied dieses spezifischen Bindungspaares benutzt, wobei jedes spezifische Bindungspaarmitglied einen Bereich an der Oberfläche oder in einem Hohlraum aufweist, der sich spezifisch an eine besondere räumliche und polare Organisation des anderen bindet und zu dieser komplementär ist. Typische spezifische Bin-

ungspaare sind in Tabelle 3 dargestellt. Derartige Sonden enthalten optional einen BLOCK, der durch ein Enzym oder Licht entfernt wird, oder R<sup>11</sup> ist H und die Verbindung fluoresziert nach der Oxidation.

Tabelle 3: Repräsentative spezifische Bindungspaare

Antigen	Antikörper
Biotin	Avidin (oder Streptavidin oder Anti-Biotin)
IgG*	Protein A oder Protein G
Arzneimittel	Arzneimittel-Rezeptor
Toxin	Toxin-Rezeptor
Kohlenhydrat	Lectin oder Kohlenhydrat-Rezeptor
Peptid	Peptid-Rezeptor
Protein	Protein-Rezeptor
Enzymsubstrat	Enzym
DNA (RNA)	aDNA (aRNA) †
Hormon	Hormon-Rezeptor
Ion	Chelator

\* IgG ist ein Immunglobulin

† aDNA und aRNA sind die (komplementären) Antisense-Stränge, die zur Hybridisierung benutzt werden

#### BLOCKIERTE Farbstoffe und andere Substrate

**[0044]** In Ausführungsformen, in denen R<sup>7</sup> eine BLOCK-Gruppierung ist (die gleich oder verschieden sein kann), welche die Fluoreszenz des Fluorophors wesentlich verändert, führt die Entfernung von BLOCK die Fluoreszenz des Mutterfarbstoffes wieder herbei. BLOCK ist typischerweise eine einwertige Gruppierung, die durch Entfernen einer Hydroxygruppe aus einem Phosphat oder Sulfat abgeleitet ist, oder ein biologisch kompatibles Salz davon, oder aus einer Carboxygruppe einer aliphatischen oder aromatischen Carbonsäure oder einer Aminosäure, einer geschützten Aminosäure, einem Peptid oder einem geschützten Peptid oder einem Alkohol oder einem Mono- oder Polysaccharid abgeleitet ist. Die BLOCK-Fluorophor-Bindung an R<sup>7</sup> ist typischerweise eine Ether- oder eine Esterbindung. Alternativ ist BLOCK eine photolabile absperrende Gruppe an einem Farbstoff oder einem Farbstoffkonjugat. Die Absperrung an R<sup>7</sup> ist typischerweise ein substituiertes oder unsubstituiertes Derivat von o-Nitroarylmethin (einschließlich  $\alpha$ -Carboxy-o-nitroarylmethin und Bis-(5-t-butoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl (Verbindung 101)), von 2-Methoxy-5-nitrophenyl oder Desyl.

**[0045]** Wo die Abspaltung von -BLOCK ein nachweisbares Ansprechen ergibt, welches das Vorhandensein einer Enzymaktivität anzeigt, ist die Verbindung ein Enzymsubstrat. Zu Enzymen, die dafür bekannt sind, dass sie diese konjugierten Gruppierungen abspalten, gehören mikrosomale Dealkylasen (z. B. Cytochrom-P450-Enzyme), Glycosidasen (z. B.  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\alpha$ -Fucosidase,  $\beta$ -Glucosaminidase), Phosphatasen, Sulfatasen, Esterasen, Lipasen, Guanidinobenzoatasen und andere. Fluorierte Fluoresceindiacetatverbindungen treten bereitwillig in unversehrte Zellen ein, in denen die Acetatgruppierungen durch intrazelluläre Esterasen in lebensfähigen Zellen gespalten werden, wodurch die Eigenfluoreszenz wiederhergestellt wird und Durchführbarkeit angezeigt wird. In ähnlicher Weise treten fluoridierte Farbstoffe, die mit Acetoxymethylestern (wie beispielsweise fluoridierten Analoga von Calcein-AM, z. B. Verbindung 99) substituiert sind, bereitwillig in unversehrte Zellen ein und können als Zell-Tracer oder Lebensfähigkeitsindikatoren dienen.

**[0046]** Jeder der Substituenten, die oben zum Zurückhalten der Farbstoffe in Zellen beschrieben sind, kann benutzt werden, um die Substrate in Zellen zurückzuhalten. Bevorzugte Enzymsubstrate sind am Bodenring fluoridiert. Besonders bevorzugte Substrate weisen zwei identische BLOCK-Gruppierungen auf, die Acetat oder Glycosid sind, wie z. B.  $\beta$ -D-Galactopyranosid, die am Bodenring mindestens tetrafluoriert sind.

**[0047]** Farbstoffverbindungen, die in wässriger Lösung einen pK<sub>s</sub> von < 6, mehr bevorzugt von kleiner als etwa 5 aufweisen, sind bevorzugte Substrate in einer sauren Umgebung (z. B. einer sauren  $\beta$ -Galactosidase, wie z. B.  $\beta$ -D-Galactopyranosid, oder in sauren Organellen, wie z. B. Substraten für Lysosomalglycosidasen (siehe Tabelle 14)). Substrate, bei denen -BLOCK durch ein Phosphataseenzym abspaltbar ist, sind nützlich,

um sowohl saure als auch alkalische Phosphatase nachzuweisen. Bevorzugte Substrate zum Nachweis von Enzymen mit maximalen Umsatzraten unter pH 7 sind an den 2'- und 7'-Positionen fluoriert.

**[0048]** Im Gegensatz zu ihren nichtfluorierten Analoga sind fluoriierte Dihydrofluoresceine ohne die Verwendung von blockierenden Gruppen, die typischerweise die Löslichkeit verringern, in wässrigen Lösungen stabil. Beispielsweise ist Verbindung 84 (9,5,6,7-Tetrafluordihydrofluorescein) in Wasser zu mindestens 2 mM löslich.

#### Anwendungsverfahren

**[0049]** Die neuen Farbstoffe werden im allgemeinen verwendet, um eine Probe anzufärben, um unter gewünschten Bedingungen ein nachweisbares optisches Ansprechen zu ergeben, indem die interessante Probe mit einer Lösung eines Farbstoffes (hergestellt gemäß Verfahren, die im Fachgebiet allgemein bekannt sind) für einen Zeitraum kombiniert wird, der ausreicht, damit die Farbstoffverbindung unter den gewünschten Bedingungen ein nachweisbares optisches Ansprechen ergibt. Die erforderliche Konzentration für die Farbstofflösung (typischerweise nanomolar bis mikromolar) wird durch systematisches Variieren der Farbstoff- oder Farbstoffkonzentration bestimmt, bis ein zufriedenstellendes Anfärben mit dem Farbstoff erreicht wird.

**[0050]** Die Farbstoffverbindungen werden am vorteilhaftesten benutzt, um Proben mit biologischen Komponenten anzufärben. Die Probe kann heterogene Mischungen aus Komponenten (einschließlich unversehrter Zellen, Zellextrakten, Bakterien, Viren, Organellen und Mischungen davon) oder eine einzelne Komponente oder eine homogene Gruppe von Komponenten (z. B. natürliche oder synthetische Aminosäuren, Nucleinsäuren oder Kohlenhydratpolymere oder Lipidmembrankomplexe) umfassen. Diese Farbstoffe sind in den verwendeten Konzentrationen für lebende Zellen und andere biologische Komponenten im allgemeinen ungiftig, obwohl diejenigen fluorierten Farbstoffe, die zusätzlich ein- oder mehrfach mit Br oder I substituiert sind, effiziente Photosensibilisatoren sind.

**[0051]** Die Probe wird gemäß bekannten Verfahren im Verlauf des Anfärbens optional mit anderen Lösungen kombiniert, einschließlich Waschlösungen, Permeabilisations- und/oder Fixierlösungen und anderen Lösungen, die zusätzliche Nachweisreagentien enthalten. Mit ausgewählten Ausführungsformen, die in Zellen gut zurückgehalten werden, bewahren die Zellen nach der Fixierung eine beträchtliche fluoreszierende Anfärbung. Wenn das zusätzliche Nachweisreagens spektrale Eigenschaften besitzt, die von denjenigen der verwendeten Farbstoffverbindungen abweichen, sind Mehrfarbenanwendungen möglich.

**[0052]** Nach dem oder während des Anfärbens wird die Probe belichtet, um ein nachweisbares optisches Ansprechen zu ergeben, und mit einem Mittel zum Nachweisen des optischen Ansprechens unter Verwendung eines Fluorometers, Mikroskops, Mikroplattenlesers, Durchflusszytometers, Laserscanners, einer Handlampe oder einer anderen Vorrichtung beobachtet. Das optische Ansprechen ist typischerweise eine Änderung der Fluoreszenz, wie z. B. eine Änderung der Intensität oder der Anregungs- oder Emissionswellenlänge, der Fluoreszenzverteilung, der Fluoreszenzlebensdauer, der Fluoreszenzpolarisierung oder eine Kombination davon.

**[0053]** Das Anfärben wird benutzt, um gemäß bekannten Verfahren die Anwesenheit, die Quantität oder die räumliche oder zeitliche Verteilung von Komponenten oder eines Mechanismus in einer Probe zu bestimmen. Die Farbstoffe der Erfindung sind zur Herstellung eines Kits gut geeignet, das einen fluorierten Reaktivfarbstoff und Anweisungen für das Konjugieren des Farbstoffs an jede beliebige Substanz, die eine geeignete funktionelle Gruppe besitzt, und optional für das Zurückgewinnen oder Reinigen der Materialien umfasst, die damit markiert sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf biologische Polymere (z. B. Proteine, Oligonucleotide oder Kohlenhydrate), polymere Harze und Kunststoffe (z. B. Polystyrol), Metalle, Gläser und andere organische oder anorganische Substanzen. Fluorierte Xanthenfarbstoffe sind auch nützliche Haptene, da die Fluorierung bei der Erkennung des Fluorophors durch den Anti-Fluorescein-Antikörper nicht stört, was typischerweise zu einer Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes führt (siehe Tabelle 15).

#### Farbstoffsynthese

**[0054]** Der erste Schritt beim Herstellen eines fluorierten Fluoresceinfarbstoffes ist die Herstellung eines entsprechend substituierten Resorcins. Obwohl Verfahren zum Herstellen von fluorierten Resorcinen bekannt sind (Patrick et al., J. ORG. CHEM. 51, 3242 (1986); Lerman et al., J. ORG. CHEM. 49, 806 (1984)), werden fluoriierte Resorcine zweckmäßiger aus einem (handelsüblichen) Polyfluornitrobenzol oder einem alkoxy-substituierten Derivat synthetisiert. Die Fluoratome in ortho- und para-Stellung zum Nitro werden mit zwei Äquivalenten von Alkoxid oder Benzylloxid verdrängt. Dann wird die Nitrogruppe reduziert, gefolgt von Diazotierung und reduktiver Dediazotierung (siehe Tabelle 4). Alternativ werden die Diazoniumkationen als reine Salze isoliert,

gefolgt von Reduktion mit Natriumborhydrid. Die Dealkylierung mit  $\text{BBr}_3$  oder einem anderen etherspaltenden Reagens oder, im Falle von Benzylethern, die katalytische Hydrogenolyse liefert reine fluoriierte Resorcine. Optional sind andere Substituenten während der Synthese anwesend, sofern diese das Syntheseverfahren überstehen, z. B. Alkyl-, Carboxyalkyl-, Chlor-, Brom-, Iod-, Alkoxy- und Hydroxygruppierungen.

**[0055]** Xanthyliumfarbstoffe, die im Xanthenabschnitt des Farbstoffes Fluorsubstituenten aufweisen, werden typischerweise durch Kondensation eines fluoriierten Resorcins mit einer Phthalsäure, einem Phthalsäureanhydrid, einer Sulfobenzoesäure oder einem Sulfobenzoesäureanhydrid (wie z. B. Phthalsäureanhydrid, Trimellitsäureanhydrid, Nitrophthalsäureanhydrid, o-Sulfobenzoesäureanhydrid, Sulfoterephthalsäure) oder mit Benzaldehyden (wenn von Oxidation gefolgt) oder mit aliphatischen Dicarbonsäuren oder -anhydriden, wie z. B. einem Bernsteinsäure- oder Glutarsäureanhydrid, hergestellt. Die Kondensation wird optional katalysiert (wie z. B. durch  $\text{ZnCl}_2$  oder Methansulfonsäure) und ergibt nach wässriger Aufarbeitung den gewünschten fluoriierten Xanthyliumfarbstoff.

**[0056]** Fluorierte Xanthyliumfarbstoffe werden auch durch Kondensieren von zwei Äquivalenten eines Resorcins mit einer fluoriierten Benzolcarbonylverbindung, wie z. B. Tetrafluorphthalsäureanhydrid, Tetrafluorphthalsäure oder Fluorphthalsäurederivaten, Pentafluorbenzoesäure und fluoriierten Benzaldehyden, wie z. B. Pentafluorbenzaldehyd, hergestellt, obwohl nach der Verwendung von fluoriierten Benzaldehyden ein Oxidationsschritt erforderlich ist, um den fluoreszierenden Xanthyliumfarbstoff zu erhalten. Die entstehenden Farbstoffe sind an dem Arylring fluoriiert, der an das Xanthenringssystem gebunden ist. Wenn der Arylring an der 4- und 6-Position fluoriiert ist, können Nucleophile, wie z. B. reduziertes Glutathion, Mercaptoessigsäure, Mercaptoethylamin und Azid das Fluoridion an der 4- oder 6-Position verdrängen, wodurch ein Syntheseweg für die nachfolgende Konjugationschemie geschaffen wird (siehe Tabelle 8). Beispielsweise wird ein Mercaptoessigsäureaddukt in einen Succinimidylester umgewandelt oder ein Mercaptoethylamino in ein Isothiocyanat, Maleimid oder Halogenacetamid umgewandelt. Alternativ wird die Azidgruppe zu einem Amin reduziert, das dann mit Iodessigsäureanhydrid acyliert wird, um ein Iodacetamid zu liefern.

**[0057]** Fluorierte Xanthyliumfarbstoffe werden auch von polyfluorierten Benzonitrilen ausgehend erhalten. Die Zugabe eines Alkoxids oder eines Benzyloxids zu dem Benzonitril verdrängt die Fluoratome in ortho- und para-Stellung zu der Nitrilgruppe. Die Zugabe eines arylorganometallischen Reagens, wie z. B. Pentafluorphenylmagnesiumchlorid, wandelt die Nitrilgruppe in ein Imin um, das anschließend hydrolysiert wird und ein substituiertes Benzophenon mit Alkoxygruppen an der 2- und 4-Position liefert. Die Alkoxygruppen werden dealkyliert, z. B. mit Bromwasserstoffsäure und Essigsäure. Die Behandlung mit  $\text{NaOH}$  in Methanol ergibt dann ein Xanthenon, in dem die 2-Hydroxygruppe das 2'-Fluoratom verdrängt hat; gleichzeitig verdrängt eine Alkoxygruppe das 4'-Fluoratom. Die 3-Hydroxygruppe im entstehenden Xanthon wird typischerweise durch eine basestabile Schutzgruppe, wie z. B. einen 2-Methoxyethylmethylether (MEM-Ether) geschützt, und dann wird der Xanthoncarbonylgruppe ein arylorganometallisches Reagens, wie z. B. Pentafluorphenylmagnesiumchlorid oder ein Alkylolithiumreagens, zugegeben. Die anschließende Behandlung mit Bromwasserstoff- und Essigsäure entwässert das entstehende tertiäre Carbinol zu dem gewünschten Xanthyliumfarbstoff, bei gleichzeitiger Umwandlung der 6-Methoxygruppe in eine Hydroxygruppe.

**[0058]** Für asymmetrische Xanthyliumfarbstoffe, wie z. B. asymmetrische Fluoresceine, kann die Kondensation unter Verwendung von einem Äquivalent jedes der geeigneten substituierten oder unsubstituierten Resorcine mit einem Äquivalent eines anderen Resorcins (wie bei Khanna et al., US-Patent Nr. 4,439,359 (1984)), eines Aminophenols und mit einem Äquivalent des geeigneten Phthalsäurederivats oder Benzaldehyds durchgeführt werden. Die Synthese kann gemeinsam oder schrittweise durchgeführt werden, wie in US-Patent Nr. 5,227,487 an Haugland et al. (1993) (siehe Tabelle 7) beschrieben.

**[0059]** Modifikationen fluorierter Xanthyliumfarbstoffe werden gemäß bekannten Verfahren zum Modifizieren von Fluoresceinen durchgeführt. Beispielsweise kann das fluoriierte Fluorescein mit einem geeigneten Halogenierungsmittel, wie z. B. flüssigem Brom (z. B. Verbindung 31) halogeniert werden. Wo die 4'- und/oder 5'-Position eines fluoriierten Fluoresceins durch Wasserstoffatome besetzt sind, können diese Positionen unter Anwendung von Mannich-Bedingungen (wie bei Kirkemo et al., US-Patent Nr. 4,510,251, oben) mit Aminomethylgruppen substituiert werden, insbesondere wenn das substituierte Amin Iminodiessigsäure oder eine Aminosäure ist. Wenn am Bodenring ein Carboxylat vorhanden ist, kann es durch Reduktion, gefolgt von der Behandlung mit  $\text{HCl}$  oder  $\text{HBr}$ , in einen Chlormethyl- oder Brommethylsubstituenten umgewandelt werden. Wo zwei isomere Carboxylate vorhanden sind, werden diese optional getrennt (Allgemeines Verfahren J) oder als eine Mischung aus Isomeren benutzt. Reduzierte Xanthyliumfarbstoffe mit der Formel 2 werden durch Reduktion des Xanthenons mit Zinkstaub oder Borhydrid in organischen Lösemitteln hergestellt (siehe Tabelle 11). Diese dihydrofluorierten Farbstoffe dienen als Substrate für Enzyme, die Elektronen aufnehmen, oder

werden beim Nachweis von Oxidationsmitteln, reaktionsfähigen Sauerstoffspezies oder Stickstoffmonoxiden verwendet. Die Herstellung anderer Enzymsubstrate enthält die Acylierung von phenolischen Hydroxylen mit Phosphat, um Phosphatasesubstrate zu ergeben, mit Carbonsäuren, um Esterasesubstrate zu ergeben, die Alkylierung, um Dealkylasesubstrate zu ergeben, und mit Kohlenwasserstoffen, um Glycosidasesubstrate zu ergeben.

**[0060]** Die Dihydroxanthen- und Xanthyliumvarianten der Farbstoffe der Erfindung sind durch gut bekannte Oxidations- oder Reduktionsmittel, einschließlich Borhydriden, Aluminiumhydriden, Wasserstoff/Katalysator und Dithioniten, frei ineinander umwandelbar. Eine Vielzahl an Oxidationsmitteln vermittelt die Oxidation von Dihydroxanthenen, einschließlich molekularem Sauerstoff in Gegenwart oder Abwesenheit eines Katalysators, Stickstoffmonoxid, Peroxynitrit, Dichromat, Triphenylcarbenium und Chloranil. Die Xanthe werden auch durch Enzymwirkung, einschließlich Meerrettich-Peroxidase in Kombination mit Peroxiden oder durch Stickstoffmonoxid, oxidiert.

**[0061]** Die untenstehenden Beispiele sind gegeben, um die praktische Anwendung dieser Erfindung zu veranschaulichen. Sie sollen den Gesamtumfang dieser Erfindung nicht begrenzen oder definieren.

### Beispiele

#### Herstellung von fluorierten Resorcinen

##### Allgemeines Verfahren A

**[0062]** Natriummethoxid (1,0 M) wird durch portionsweises Zugeben von metallischem Natrium zu wasserfreiem Methanol (Aldrich) unter Stickstoff bei 0°C hergestellt. Zu einem reinen fluorierten Nitrobenzol (1,0 Äquiv.) unter Stickstoff bei Raumtemperatur wird über 5 bis 10 Minuten Natriummethoxidlösung (2,2 Äquiv.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt. Sobald die DC-Analyse zeigt, dass die Reaktion vollzogen ist (1 bis 24 Stunden), werden mehrere Tropfen 1 M Zitronensäure zugegeben. Wasser wird zugegeben, gefolgt von der Extraktion mit Ether. Die organische Schicht wird mit Sole gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, eingedampft und aus Hexanen/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umkristallisiert, um das gewünschte Dimethoxyfluornitrobenzol zu erhalten.

##### Allgemeines Verfahren B

**[0063]** Die Nitrogruppe des Fluornitrobenzols wird durch katalytische Hydrierung bei 40 psi in Ethanol/Ethylacetat über 10% Pd/C reduziert. Wenn die DC-Analyse zeigt, dass die Reaktion vollzogen ist, wird der Katalysator durch Filtration entfernt und das Filtrat wird verdampft, um das reine, aminsubstituierte fluorierte Benzol zu ergeben.

##### Allgemeines Verfahren C

**[0064]** Die Nitrogruppe des Fluornitrobenzols wird durch homogene Reduktion in Ethylacetat/Ethanol (2:1, 0, 10 M) unter Rückfluss und Verwendung von Zinn(II)-chloridhydrat (5 Äquiv.) reduziert. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels DC überwacht. Die Reaktionsmischung wird gekühlt, in Wasser gegossen und mit 1 M NaOH auf pH 7 neutralisiert. Die Mischung wird mit Ethylacetat extrahiert, mit Sole gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

##### Allgemeines Verfahren D

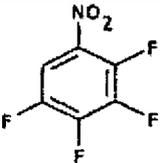
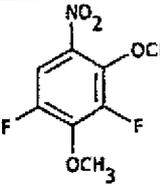
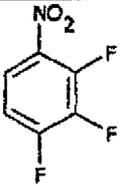
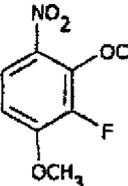
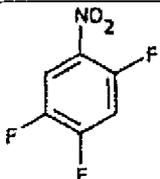
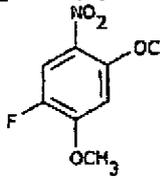
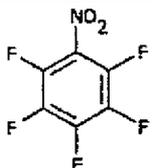
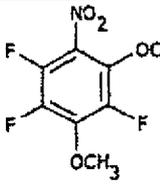
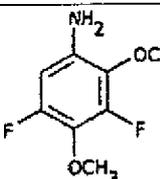
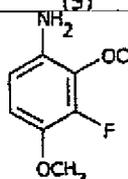
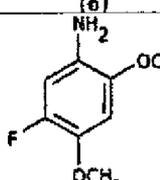
**[0065]** Das gewünschte Aminofluorbenzol in Wasser/HCl (2:1, 0,3 M) wird in Eis gekühlt und mit einer kalten Lösung aus NaNO<sub>2</sub> (1,05 Äquiv.) in Wasser behandelt. Die Diazoniumsalzlösung wird 15 Minuten lang gerührt, dann wird hypophosphorige Säure (50%ige wässrige Lösung, 20 Äquiv.) über 5 Minuten zugegeben. Die Mischung wird zwei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Wasser verdünnt. Die Mischung wird mit wässrigem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oder NaOH neutralisiert und zweimal mit Ether extrahiert. Der organische Extrakt wird mit Wasser, dann mit Sole gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösung wird eingedampft und der Rückstand wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt.

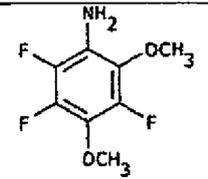
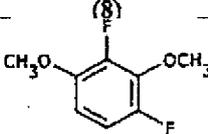
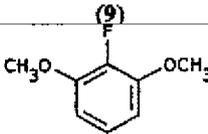
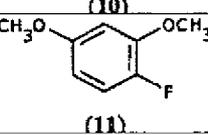
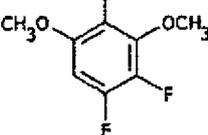
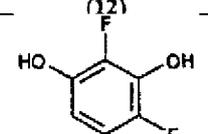
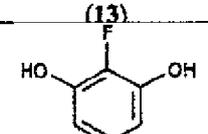
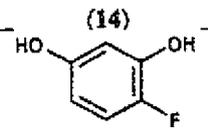
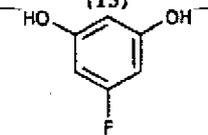
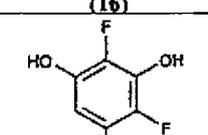
## Allgemeines Verfahren E

**[0066]** Eine Lösung des fluorierten Dimethoxybenzols in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0,3 M) bei Raumtemperatur unter Stickstoff wird mit einer Spritze mit  $\text{BBr}_3$  (3,0 Äquiv., 1,0 M in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) über fünf Minuten behandelt. Die DC zeigt, dass die Reaktion 24 bis 48 Stunden benötigt, um Vollständigkeit zu erreichen; manchmal sind zusätzliche 0,5 Äquiv.  $\text{BBr}_3$ -Lösung notwendig, um Vollständigkeit zu erreichen. Die Lösung wird sorgfältig mit Wasser abgeschreckt und gerührt, um Niederschlag aufzulösen. Die Lösung wird mit Ether extrahiert, die Extrakte werden mit Sole gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft und mittels Sublimation gereinigt, um das gewünschte fluorierte Resorcin zu ergeben.

Tabelle 4: Referenzverbindungen

Ausgangs- material	Verf.	Produkt (Brchn. Nr.)	Ertrag	m.p. (°C)	Analyse
-----------------------	-------	-------------------------	--------	--------------	---------

	A	 (1)	99 %	32-32,5	%C: 43,84 %H: 3,15 %N: 6,15
	A	 (2)	99 %	59-61	%C: 47,46 %H: 4,05 %N: 6,08
	A	 (3)	88 %	146-149	%C: 47,81 %H: 3,96 %N: 6,84
	A	 (4)	98 %	Öl	%C: 40,45 %H: 2,68 %N: 5,69
1	B	 (5)	100 %	braunes Öl	%C: 50,61 %H: 4,81 %N: 7,26
2	C	 (6)	92 %	Öl	%C: 56,14 %H: 6,05 %N: 8,03
3	B	 (7)	100 %	47-49	%C: 56,76 %H: 6,04 %N: 8,20

4	C		52 %	146-148	%C: 39,79 %H: 3,70 %N: 5,62
5	D		73 %	Öl	%C: 54,76 %H: 4,63
6	D		96 %	Öl	%C: 61,36 %H: 5,86
7	D		81 %	Öl	%C: 61,62 %H: 5,94
8	D		80 %	Öl	%C: 49,63 %H: 3,69
9	E		90 %	100-101	%C: 48,96 %H: 3,21
10	E		95 %	114-116	%C: 55,05 %H: 3,96
11	E		100 %	94-96	%C: 56,23 %H: 3,93
	E		92 %	134-136	%C: 56,33 %H: 3,98
12	E		100 %	69-71	%C: 39,58 %H: 2,65

## Herstellung von fluorierten Fluoresceinen

## Allgemeines Verfahren H

**[0067]** Ein fluoriertes Resorcin (2 Äquiv.), eine Phthalsäure oder ein Phthalsäureanhydrid (1 Äquiv.) und wasserfreies  $ZnCl_2$  (2,5 Äquiv.) werden bei etwa 170 bis 180°C 30 Minuten lang unter Rühren geschmolzen. Die abgekühlte Mischung wird in Wasser suspendiert und abgenutscht. Der Feststoff, der das fluorierte Fluorescein

enthält, wird durch Auflösen in Methanol/Wasser, gefolgt von Filtration durch Diatomeenerde und Eindampfen, weiter gereinigt.

#### Allgemeines Verfahren H'

**[0068]** Alternativ wird das rohe fluoriierte Fluorescein aus Verfahren H in Essigsäureanhydrid und Pyridin unter kurzem Erhitzen in ein Diacetat umgewandelt, und die Mischung der wässrigen Aufarbeitung und chromatographischen Reinigung oder Umkristallisierung des/der in organischen Lösemitteln löslichen Produkts/Produkte unterworfen.

#### Allgemeines Verfahren I

**[0069]** Alternativ werden ein gewünschtes fluoriiertes Resorcin (2 Äquiv.) und ein Phthalsäureanhydrid (1 Äquiv.) in Methansulfonsäure als eine 10 gew./vol.-%ige Lösung für 48 Stunden auf 80 bis 85°C erhitzt. Die abgekühlte Lösung wird in 7 Volumina einer Eis/Wasser-Mischung gegossen. Der Niederschlag wird aufgefangen, mit kaltem Wasser gewaschen, unter Vakuum bei 60°C getrocknet und, wie unter Verfahren H beschrieben, gereinigt.

#### Allgemeines Verfahren I'

**[0070]** Brom (6 Äquiv.) wird tropfenweise einer Lösung eines fluoriierten Farbstoffes (1 Äquiv.) in MeOH zugegeben. Die Mischung wird 3 Stunden lang gerührt, dann eingedampft. Der Rückstand wird mit Essigsäureanhydrid und Pyridin 1 Stunde lang gerührt, mit Ethylacetat verdünnt, mit 1 M Zitronensäure, dann mit Sole gewaschen und eingedampft. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie gereinigt, um den bromierten Farbstoff zu erhalten.

#### Allgemeines Verfahren J

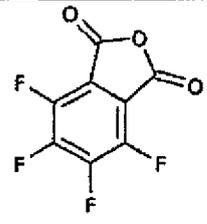
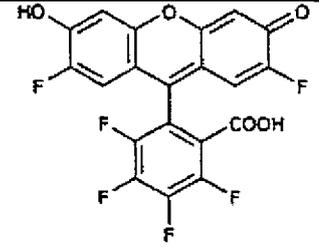
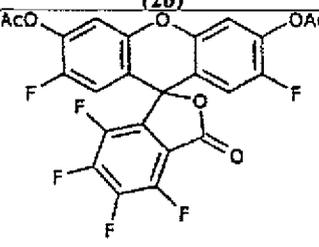
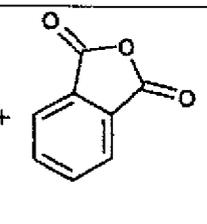
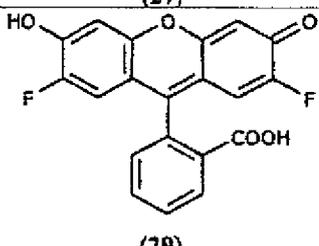
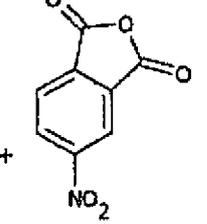
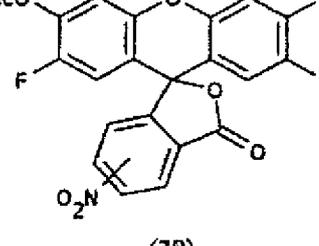
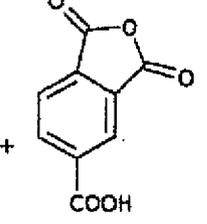
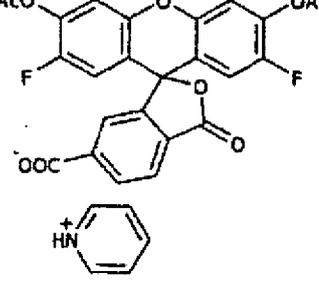
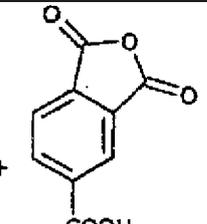
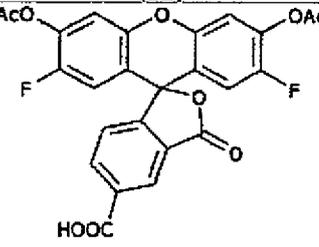
**[0071]** Isolierung von Carboxyfluorescein-Isomeren: Das fluoriierte Carboxyfluorescein (1 Äquiv.), Pyridin (4 Äquiv.) und Essigsäureanhydrid (100 Äquiv.) werden 5 Minuten lang auf 80°C erhitzt. Die Reaktion wird 24 Stunden lang auf -4°C gekühlt. Der kristalline Niederschlag (das Pyridiniumsalz des 6-isomeren Diacetats) wird aufgefangen, mit Essigsäureanhydrid, dann mit Ether gewaschen und getrocknet, um ein gebrochen weißes Pulver zu ergeben. Das Filtrat wird zusammen mit einem gleichen Volumen Wasser 30 Minuten lang gerührt und mit Ethylacetat extrahiert. Der kombinierte Extrakt wird mit Sole gewaschen, getrocknet, eingedampft und aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wieder kristallisiert, um das 5-isomere Diacetat als die freie Säure zu ergeben. Das Filtrat wird konzentriert, in Toluol wieder aufgelöst, 1,5 Äquiv. Pyridin werden zugegeben, und die Lösung wird bei 20°C 15 Stunden lang stehen gelassen. Der entstehende Niederschlag wird aufgefangen, mit Toluol, dann mit Ether gewaschen und getrocknet, um weiteres 6-isomeres Diacetat als das Pyridiniumsalz zu ergeben. Das Filtrat wird mit Ethylacetat verdünnt, zweimal mit 1 M Zitronensäure, dann mit Sole gewaschen, getrocknet, konzentriert und aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wieder kristallisiert, um eine zweite Menge des 5-isomeren Diacetats als die freie Säure zu erhalten.

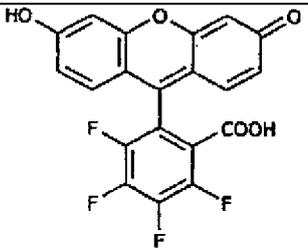
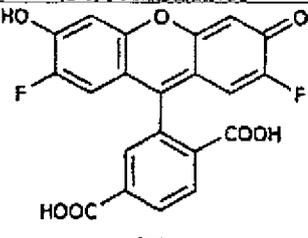
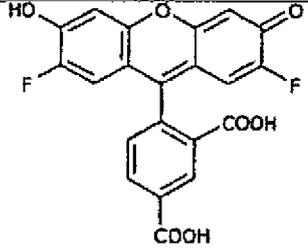
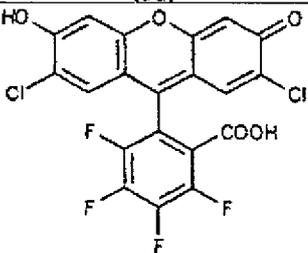
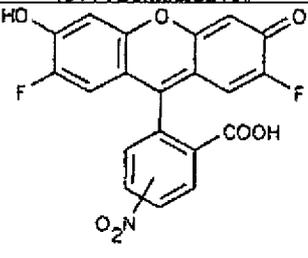
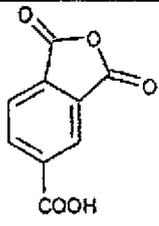
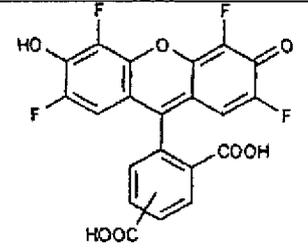
#### Allgemeines Verfahren K

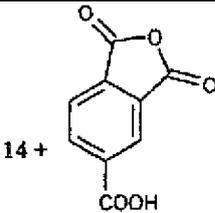
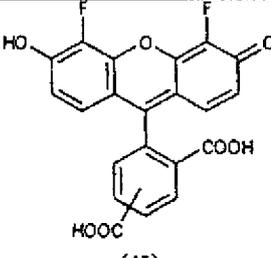
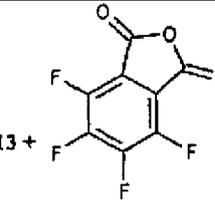
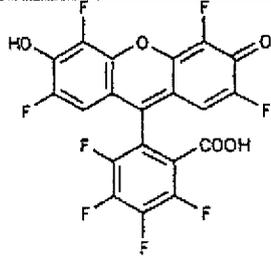
**[0072]** Hydrolyse eines fluoriierten Fluoresceindiacetats: Eine 0,1 M Lösung des Diacetats in THF/MeOH/Wasser (4:4:2) wird bei 20°C mit NH<sub>4</sub>OH (10 Äquiv.) behandelt. Nach 2 Stunden wird die Reaktionsmischung in 7 Volumina Eiswasser gegossen und mit HCl auf pH 2 angesäuert. Der Niederschlag wird aufgefangen, mit kaltem Wasser gewaschen und bei 60°C getrocknet, um das Produkt zu ergeben.

Tabelle 5: Verbindungen 27, 30, 32, 33, 34, 37, 40, 41 und 42 sind Vergleichsbeispiele

Reaktionspartner	Verfahren	Produkt (Berechn. Nr.)	Ertrag, Kennzeichen
------------------	-----------	---------------------------	------------------------

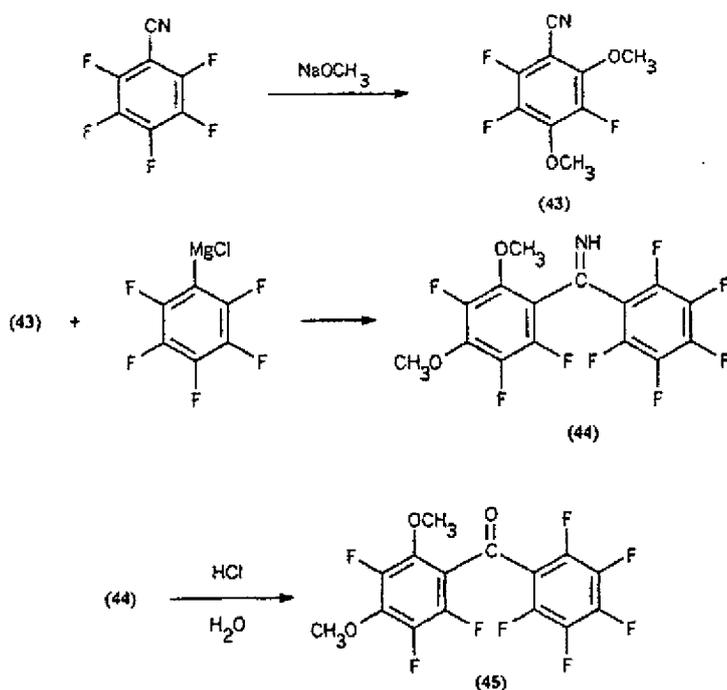
<p>15 +</p> 	I	 <p>(26)</p>	83 %
26 + Ac <sub>2</sub> O	H'	 <p>(27)</p>	90 %
<p>15 +</p> 	H	 <p>(29)</p>	85 %
<p>15 +</p> 	H + H'	 <p>(30)</p>	78 % (gemischte Isomere)
<p>15 +</p> 	H + J	 <p>(32)</p>	44 % %C: 62,01 %H: 3,25 %N: 2,37
<p>15 +</p> 	H + J	 <p>(33)</p>	48 % %C: 59,57 %H: 2,53

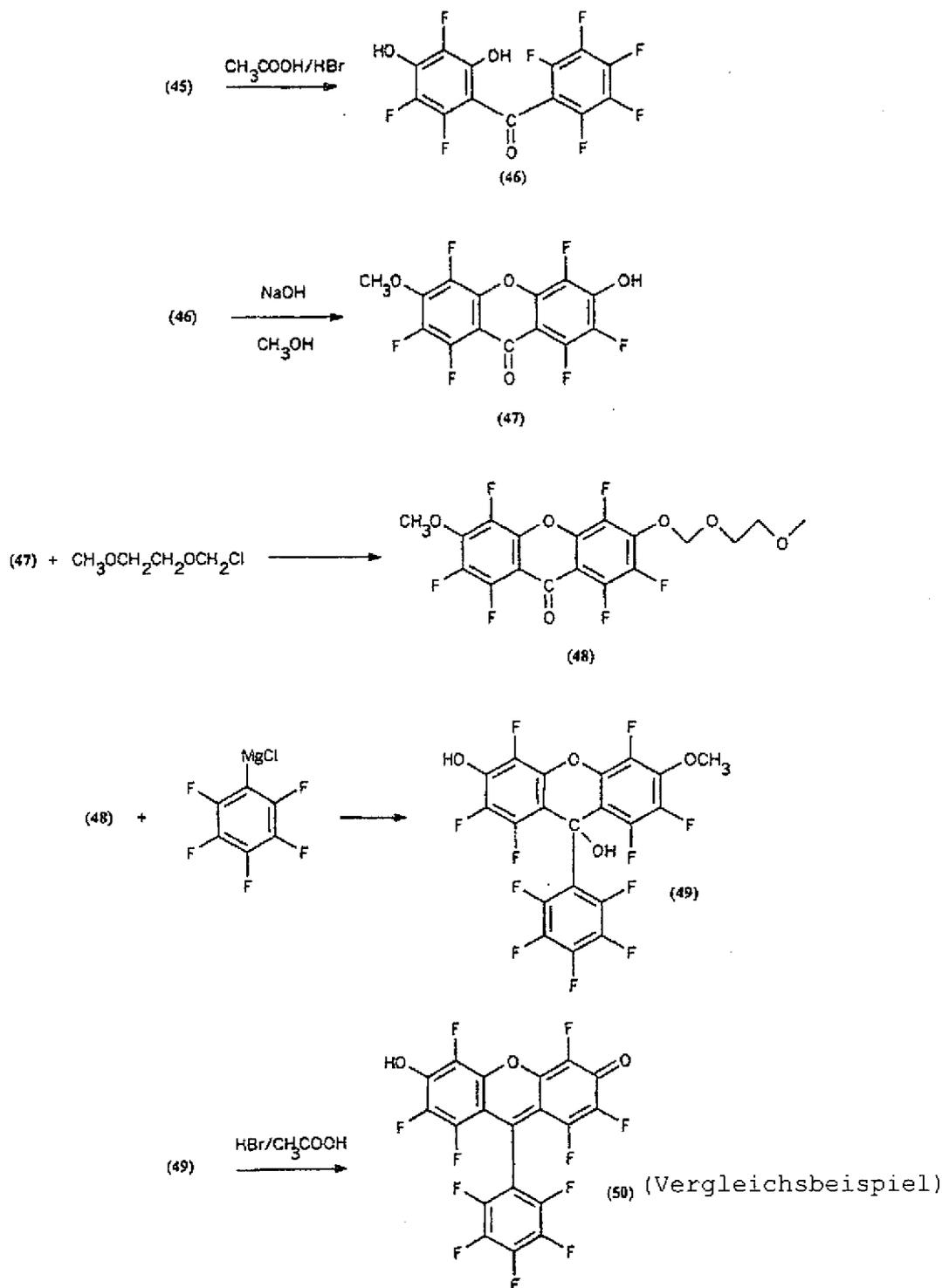
25 + NH <sub>4</sub> OH	K	 <p>(34) (Comparative)</p>	90 % %C: 59,39 %H: 1,99
32 + NH <sub>4</sub> OH	K	 <p>(35)</p>	92 %
33 + NH <sub>4</sub> OH	K	 <p>(36)</p>	83 %
28 + NH <sub>4</sub> OH	K	 <p>(37) (Comparative)</p>	85 %
30 + NH <sub>4</sub> OH	K	 <p>(38)</p>	92 %
13 + 	H	 <p>(40)</p>	24 % %C: 54,58 %H: 2,31

 <p>14 +</p>	H	 <p>(41)</p>	<p>82% (roh)</p> <p>%C: 57,70 %H: 2,88</p>
 <p>13 +</p>	H	 <p>(42)</p>	<p>25 %</p> <p>Abs<sub>max</sub>: 535 nm Em<sub>max</sub>: 553 nm (MeOH)</p>

## Herstellung von 1',8'-substituierten fluorierten Fluoresceinen

**[0073]** 1',8'-substituierte fluorierte Fluoresceine werden, wie in der Beschreibung beschrieben, aus polyfluorierten Benzonitrilen hergestellt. Das unten stehende Reaktionsschema stellt die Herstellung von 1,2,4,5,7,8-Hexafluor-6-hydroxy-9-pentafluorphenylxanthen-3-on als Beispiel dar. Die Auswahl von entsprechend substituiertem Benzonitril und arylorganometallischen Gruppen wird zu dem gewünschten fluorierten Farbstoff führen.





## Herstellung von fluorierten Xanthenen

## Herstellung von 2,7-Difluor-6-hydroxy-9-trifluormethylxanthen-3-on (56)

**[0074]** 4-Fluorresorcin (Verbindung 15, 0,10 g, 0,78 mmol) wird mit Trifluoressigsäure (45 mg, 0,39 mmol) bei 80°C in Methansulfonsäure kondensiert. Das gewünschte Produkt wird durch die Zugabe eines Überschusses an Wasser aus der Reaktionslösung gefällt. Das Produkt wird filtriert und getrocknet, um Verbindung 56 als ein rötliches Pulver zu ergeben.

## Herstellung von 2,7-Difluor-6-hydroxy-1-(1-naphthyl)xanthen-3-on (57)

**[0075]** Zwei Äquivalente von 4-Fluorresorcin (Verbindung 15) werden mit einem Äquivalent Naphthalin-1-carboxyaldehyd in warmer Methansulfonsäure kondensiert. Wenn die Reaktion durch DC-Analyse als vollzogen

beurteilt wird, wird das Zwischenprodukt mit Wasser aus der Reaktionslösung gefällt. Der rohe Feststoff wird filtriert und getrocknet. Das Zwischenprodukt wird in Chloroform aufgelöst und mit Chloramin-T im Überschuss behandelt. Wenn die Oxidation vollständig ist, wie mittels DC beurteilt, werden die flüchtigen Bestandteile entfernt und das Rohprodukt mittels Chromatographie gereinigt, um Verbindung 57 zu ergeben.

#### Herstellung von derivatisierten fluorierten Fluorophoren

##### Allgemeines Verfahren M zur Herstellung von Thioetherderivaten

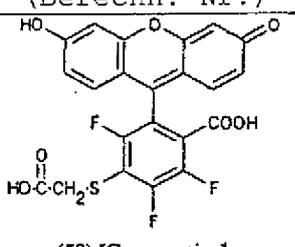
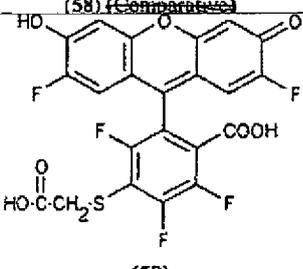
**[0076]** Eine Lösung aus dem gewünschten am „Bodenring“ fluorierten Fluorescein (1 Äquiv.) und Mercaptoessigsäure (1,2 Äquiv.) in DMF, als 5 gew./vol.-%ige Lösung, wird 40 Minuten lang auf 80°C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird in Eiswasser gegossen, mit Ethylacetat extrahiert, mit Sole gewaschen, getrocknet, eingedampft und unter Anwendung der Silicagel-Säulenchromatographie unter Eluieren mit  $\text{CHCl}_3$ :Methanol:Essigsäure (85:15:0,3), dann THF:Trifluoressigsäure (100:0,5) gereinigt. Die Fraktionen, die das reine Produkt enthalten, werden kombiniert und eingedampft. Der Rückstand wird in einem Minimum an THF gelöst und in Petrolether (Sdp. 30 bis 60°C) filtriert. Der Niederschlag wird aufgefangen, mit Petrolether gewaschen und getrocknet.

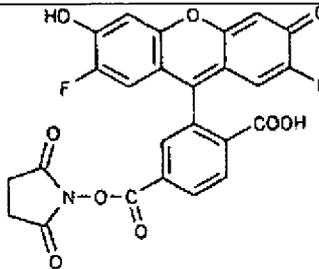
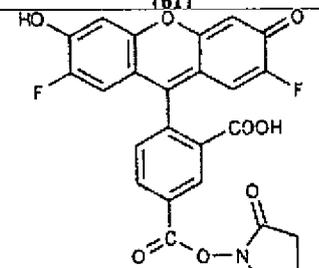
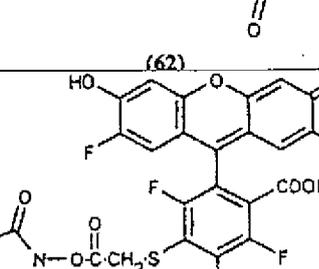
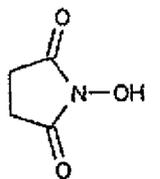
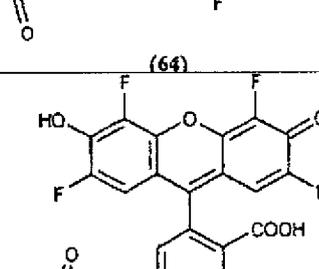
##### Allgemeines Verfahren N zur Herstellung von Succinimidesterderivaten

**[0077]** Zu einer Pyridinlösung des geeigneten fluorierten Fluoresceins werden 1,3 Äquiv. Succinimidyltrifluoracetat (STFA, hergestellt aus N-Hydroxysuccinimid und Trifluoressigsäureanhydrid) gegeben. Zusätzliches STFA ( $2 \times 1$  Äquiv) wird zugegeben, um die Reaktion zur Vollständigkeit zu zwingen. Nach 16 Stunden bei 20°C wird die Reaktionsmischung mit Ether verdünnt, mit 1 M Zitronensäure, dann mit Sole gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird unter Anwendung der Säulenchromatographie und Eluieren mit  $\text{CHCl}_3$ :Methanol:Essigsäure (95:5:0,1 bis 80:20:0,1 Stufengradient) gereinigt, um das gewünschte Produkt zu ergeben.

**[0078]** Alternativ wird ein carbonsäuresubstituiertes fluoriertes Fluorescein an N-Hydroxysuccinimid gekoppelt, unter Verwendung eines Carbodiimid-Kopplungsmittels, wie z. B. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDAC) oder N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), und mittels Verfahren, die im Fachgebiet gut bekannt sind.

Tabelle 6. Verbindungen 58 und 65 sind Vergleichsbeispiele

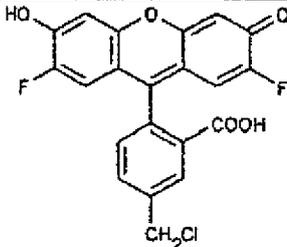
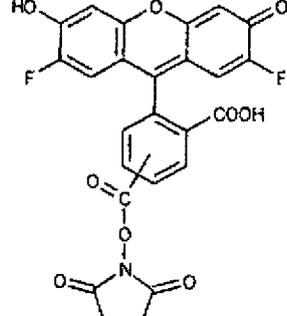
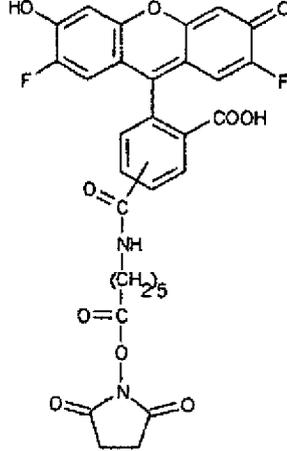
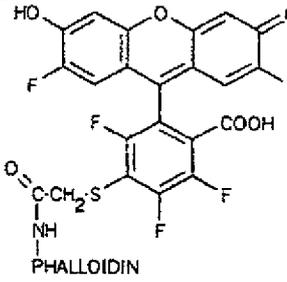
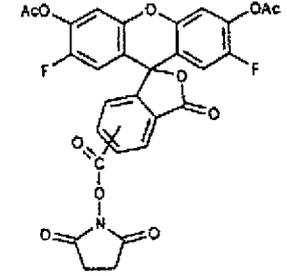
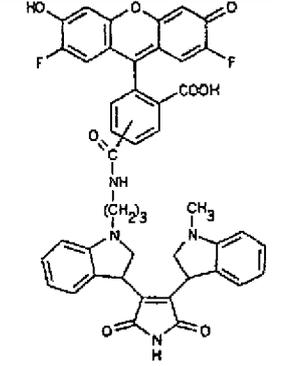
Reaktionspartner	Verfahren	Produkt (Berechn. Nr.)	Ertrag
34	M	 (58) (Comparative)	80 %
26	M	 (59)	77 %

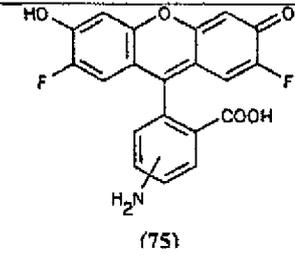
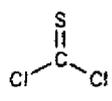
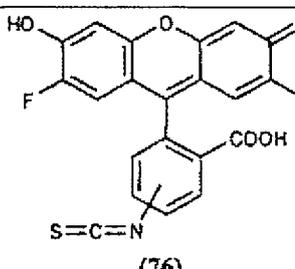
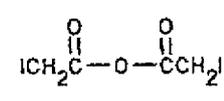
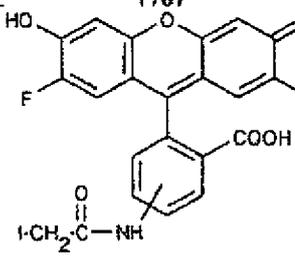
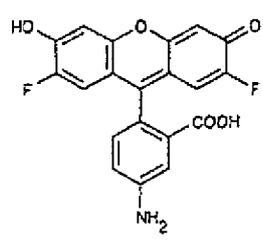
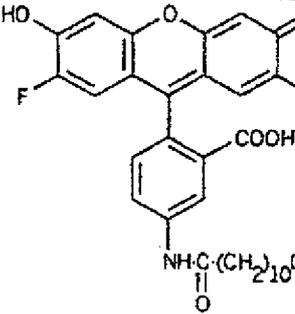
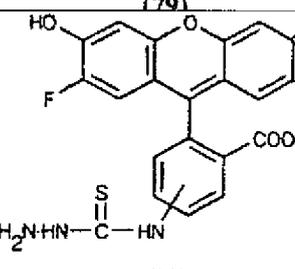
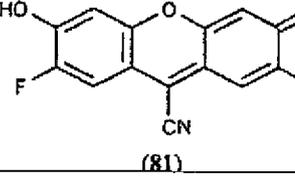
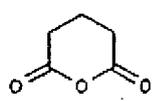
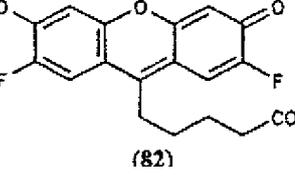
35	N	 (61)	70 %
36	N	 (62)	72 %
59	N	 (64)	67 %
40 + 	EDAC-Kopplung	 (65)	22 %

[0079] Andere Derivate von fluoriertem Fluorescein werden mittels Verfahren hergestellt, die im Fachgebiet bekannt sind, wie in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7

Ausgangsmaterial	Reagens	Produkt (Berechn. Nr.)
------------------	---------	---------------------------

<p>(33)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Ethylchloroformat</li> <li>2) NaBH<sub>4</sub></li> <li>3) H<sup>+</sup>, Ac<sub>2</sub>O</li> <li>4) HCl/AcOH</li> </ol>	 <p>(71)</p>
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH</li> <li>2) EDAC·HCl</li> <li>3) N-Hydroxysuccinimid</li> </ol>	 <p>(72)</p>
<p>64</p>	<p>Aminophalloidin-<i>p</i>-toluensulfonat</p>	 <p>PHALLOIDIN (73)</p>
	<p>Bis-Indolyl- Maleimid<sup>1</sup></p>	 <p>(74)</p>

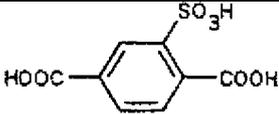
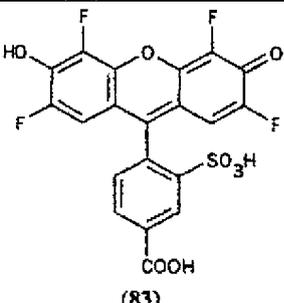
38	$\text{SnCl}_2$	 <p>(75)</p>
75		 <p>(76)</p>
75		 <p>(77)</p>
	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COCl}$	 <p>(79)</p>
76	$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$	 <p>(80)</p>
15	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Formaldehyd</li> <li>2) Chloramin-T</li> <li>3) NaCN</li> </ol>	 <p>(81)</p>
15		 <p>(82)</p>

1) Bis-indolylmaleimid: 2-(1-(3-Aminopropyl)-indol-3-yl)-3-(1-methylindol-3-yl)maleimid

## Herstellung von fluorierten Sulfonfluoresceinen und ihren Analogen

[0080] In einer Abwandlung des allgemeinen Verfahrens H ergibt die Kondensation eines entsprechend fluorierten Resorcins mit Sulfoterephthalsäure das gewünschte fluorierte Sulfonfluorescein.

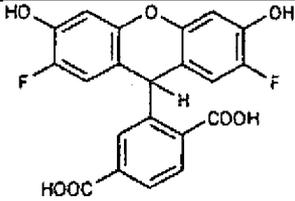
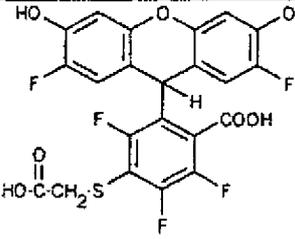
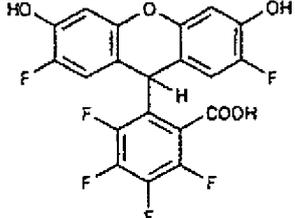
Tabelle 8. Vergleichsbeispiel.

Ausgangsmaterial	Reaktionspartner	Produkt (Berechn. Nr.)
13		 (83)

## Herstellung von fluorierten Dihydrofluoresceinen

[0081] Fluorierte Fluoresceine lassen sich leicht in ihre reduzierten Dihydrofluorescein-Analoga umwandeln. Das geeignete fluorierte Fluorescein wird in Essigsäure oder Essigsäure/Methanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Luft mit Zinkstaub behandelt. Nach 1- bis 3tägigem Rühren wird die Mischung filtriert und das Rohprodukt mittels Chromatographie auf SEPHADEX LH-20 gereinigt.

Tabelle 9

Ausgangsmaterial	Reagens	Produkt (Berechn. Nr.)	Ertrag
35	Zn-Staub	 (85)	100 %
59	Zn-Staub	 (87)	---
26	Zn-Staub	 (88)	40 %

Herstellung von fluorierten  $\beta$ -Galactosidasesubstraten

## Allgemeines Verfahren O

**[0082]** Eine Mischung aus dem gewünschten fluorierten Fluorescein (1 Äquivalent), Tetra-O-acetylbromgalactose (1,5 Äquivalente) und Silber(I)-oxid (1,5 Äquivalente) in wasserfreiem THF (0,02 M in Farbstoff) wird bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Die Reaktion benötigt 72 bis 96 Stunden bis zur Vollständigkeit; nach Bedarf wird mehr Silberoxid zugegeben. Die Mischung wird filtriert und durch Eindampfen konzentriert. Der Rückstand wird mittels Flash-Chromatographie gereinigt, um ein reines monoalkyliertes Produkt zu ergeben. Mit diesem Verfahren wird 2',7'-Difluorfluorescein, Tetra-O-acetylgalactosid (90) in 92%iger Ausbeute aus Verbindung 29 hergestellt.

## Allgemeines Verfahren P

**[0083]** Eine Mischung aus dem gewünschten fluorierten Fluoresceinmono(tetra-O-acetyl)galactosid (1 Äquivalent), Tetraacetobromgalactose (1,5 Äquivalente) und Cadmiumcarbonat (1,5 Äquivalente) in trockenem Toluol wird vier Tage lang unter Rückfluss erwärmt. Die abgekühlte Reaktionsmischung wird filtriert und das Filtrat konzentriert. Der Rückstand wird chromatographisch gereinigt, um die nichtfluoreszierenden geschützten Galactosidasesubstrate zu ergeben. Mit diesem Verfahren wird 2',7'-Difluorfluorescein, Bis-tetra-O-acetylgalactosid (92) in 62%iger Ausbeute aus Verbindung 90 hergestellt.

**[0084]** Die Acetylenschutzgruppen werden durch Reaktion der geschützten Galactosidase mit weniger als einem Äquiv. Natriummethoxid oder Lithiumhydroxid entfernt. Die Reaktion wird mit wässriger Zitronensäure gelöscht, und das Produkt wird mittels präparativer DC oder Chromatographie auf SEPHADEX LH-20 gereinigt. Auf diese Weise wird 2',7'-Difluorfluorescein, Bis-O-galactosid (94) aus Verbindung 92 hergestellt.

## Herstellung von alkalischen Phosphatasesubstraten

## Allgemeines Verfahren Q

**[0085]** Das allgemeine Schema für die Herstellung von fluorierten Fluoresceinphosphatasesubstraten erfordert typischerweise die anfängliche Phosphorylierung des Fluorophors mit Phosphoroxidchlorid. Der Fluoresceinfarbstoff wird typischerweise in Pyridin bei 0°C unter Stickstoff aufgelöst. Der Fluoresceinlösung wird eine Pyridinlösung von  $\text{POCl}_3$  zugegeben. Nachdem die Reaktion mittels DC als vollständig beurteilt wurde, wird die Reaktion mit zerstoßenem Eis gelöscht und mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  auf pH 7,0 neutralisiert. Das Pyridin wird mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase wird lyophilisiert. Das Rohmaterial wird auf SEPHADEX LH20 unter Eluieren mit Wasser gereinigt. Die Fraktionen des Reinprodukts werden vereinigt, gefroren und lyophilisiert, um reine fluorierte Fluoresceindiphosphate als ihre Tetraammoniumsalze als blassgelbe Feststoffe zu ergeben.

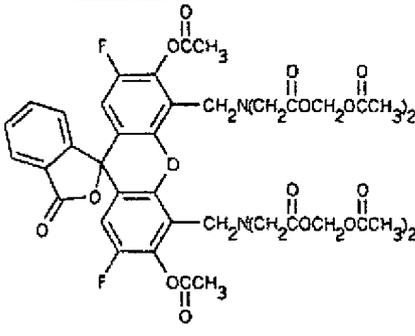
**[0086]** Mit dem Verfahren Q wird 2',7'-Difluorfluorescein (29) in 2',7'-Difluorfluoresceindiphosphat, Tetraammoniumsalz (96) umgewandelt, und 2',4,5,6,7,7'-Hexafluorfluorescein (26) wird in 2',4,5,6,7,7'-Hexafluorfluoresceindiphosphat, Tetraammoniumsalz (97) umgewandelt.

## Herstellung von fluorierten Analogen von Calcein-AM

## Allgemeines Verfahren R

**[0087]** Der fluorierte Farbstoff wird in Ethanol gelöst, und 6 M KOH wird zugegeben, um eine 0,2 M Lösung herzustellen. Die entstehende Lösung wird mit 3 Äquiv. Iminodiessigsäure, gefolgt von wässrigem Formaldehyd (4 Äquiv.) behandelt. Die Lösung wird über Nacht auf 65°C erwärmt; dann wird ihr Volumen mit Wasser/Ethanol verdoppelt. Der pH wird unter Verwendung von wässrigem HCl auf 2,0 gesenkt und der Niederschlag mittels Filtration aufgefangen. Das Zwischenprodukt wird durch Verreiben mit Aceton teilweise gereinigt, gefolgt von Filtration, Suspendieren in DMF und Behandlung mit 10 Äquiv. Diisopropylethylamin (DIEA) und Essigsäureanhydrid (4 Äquiv.). Nach 30 Minuten wird weiteres DIEA (7 Äquiv.) zugegeben, gefolgt von tropfenweise zugegebenem Wasser, bis Homogenität erreicht ist. Brommethylacetat (15 Äquiv.) wird zugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Die Mischung wird zwischen Ethylacetat und Wasser aufgeteilt. Die organische Schicht wird mit Sole gewaschen, konzentriert und dann mittels präparativer DC unter Verwendung von Hexan: Ethylacetat als Elutionsmittel gereinigt, wodurch das reine Produkt als ein farbloses Öl erhalten wird.

Tabelle 10. Vergleichsbeispiel

Ausgangsmaterial	Verfahren	Produkt (Berechn. Nr.)
29	R	 <p>(99)</p>

## Herstellung von abgesperrten fluorierten Fluorophoren

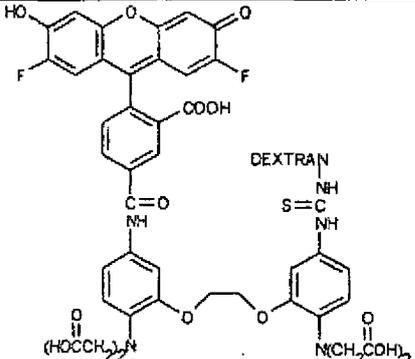
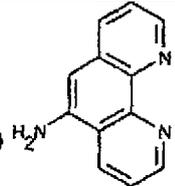
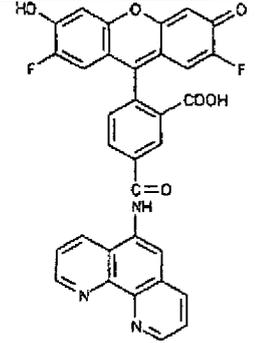
**[0088]** Fluorierte Fluorophore werden unter Anwendung von Verfahren, die im Fachgebiet des Absperrens von Fluoresceinen gut bekannt sind, abgesperrt. Beispielsweise liefert die Behandlung von 2',4,5,6,7,7'-Hexafluorfluorescein (26) mit 5-(t-Butoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylidiodid und  $\text{Ag}_2\text{O}$ , gefolgt von der Reinigung unter Anwendung von Chromatographie, nichtfluoreszierendes, durch Bis-(5-t-butoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl abgesperrtes 2',4,5,6,7,7'-Hexafluorfluorescein (101) in 46%iger Ausbeute. Das Produkt ist anfänglich löslich, wird jedoch bei Bestrahlung fluoreszierend.

## Herstellung von Ionenindikatoren, in die fluorierte Fluorophore einbezogen sind

**[0089]** Ionenindikatoren, in die fluorierte Fluorophore einbezogen sind, lassen sich unter Anwendung veröffentlichter Verfahren leicht herstellen.

Tabelle 11. Verbindungen 102 und 104 sind Vergleichsbeispiele

Ausgangs- material	Reagens	Produkt (Berechn. Nr.)
33	Isobutylchloroformat  (91 % Ertrag)	<p>(102)</p>
102	a) 5-Amino-BAPTA, Tetramethylester  b) KOH  (32 % Ertrag)	<p>(103)</p>
102	5-Amino-BAPTA, Tetraacetoxymethyl- ester'  (52 % Ertrag)	<p>(104)</p>

102	a) 5, 5'-Diamino-BAPTA, Tetramethylester'  b) Thiophosgen  c) Aminodextran	 <p>(105)</p>
102	a)   b) NH <sub>4</sub> OH	 <p>(106)</p>

' US-Patent Nr. 5,453,517 an Kuhn et al., (1995)

#### Herstellung eines Nucleotidkonjugats von 2',7'-Difluorfluorescein-5-(und-6-)-Carbonsäure

**[0090]** Zu 2 mg 5-(3-Aminoallyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat, Ammoniumsalz in 100 µl Wasser werden 3 mg von Verbindung 72 in 100 µl DMF, gefolgt von 5 µl Triethylamin, zugegeben. Nach 3 Stunden bei Raumtemperatur wird die Lösung eingedampft und der Rückstand auf lipophilem SEPHADEX unter Verwendung von Wasser zur Eluierung gereinigt. Die ersten grün fluoreszierenden Fraktionen werden kombiniert und lyophilisiert, um das fluoreszierende Nucleotidkonjugat als einen orangefarbenen Feststoff (Verbindung 107) zu ergeben.

**[0091]** Alternativ wird ein fluoreszierendes Konjugat (Verbindung 108) von Desoxyuridin-5'-triphosphat unter Verwendung von 5-(3-Amino-1-propinyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat an Stelle von 5-(3-Aminoallyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (wie oben in Hobbs, Jr. et al. beschrieben) hergestellt.

#### Herstellung eines Oligonucleotidkonjugats von 2',4',5',7'-Tetrafluorfluorescein-5-(und-6-)-Carbonsäure

**[0092]** Eine Probe von 500 µg einer mit 5'-Amin modifizierten, 24-basigen M13-Primersequenz wird in 220 µl 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5 gelöst. Dazu wird 1 mg von Verbindung 65 in 35 µl DMF gegeben. Nach 16 Stunden bei Raumtemperatur werden 15 µl 5 M NaCl und 3 Volumina kaltes 100%iges Ethanol zugegeben. Die Mischung wird auf -20°C abgekühlt, zentrifugiert, das überstehende Ethanol wird abdekantiert, und das Pellet wird gespült und in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Das markierte Oligonucleotid wird mittels HPLC auf einer 300A-C8-Umkehrphasensäule unter Anwendung eines Steigungsgradienten von 0,1 M Triethylammoniumacetat (pH ~7) und Acetonitril (15-60% in 30 Minuten) gereinigt. Der gewünschte Peak wird aufgefangen und eingedampft, um das fluoreszierende Oligonucleotid zu ergeben.

#### Herstellung eines Arzneimittelkonjugats von 2',7'-Difluorfluorescein-5-(und-6-)-isothiocyanat

**[0093]** Ein fluoreszierender Dopamin-D2-Antagonist wird wie folgt hergestellt:

Zu 10 mg N-(p-Aminophenethyl)piperon (Amlaiky et al., FEBS LETT, 176, 436 (1984)) und 10 µl N,N-Diisopropylethylamin in 1 ml DMF werden 15 mg 2',7'-Difluorfluorescein-5-(und-6-)-isothiocyanat (Verbindung 76, Beispiel 77) gegeben. Nach 3 Stunden wird die Reaktionsmischung in 5 ml Diethylether gegossen. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren aufgefangen und durch Chromatographie auf Silicagel unter Verwendung von 10% Methanol in Chloroform gereinigt, um das reine Produkt als einen orangefarbenen Feststoff zu ergeben.

## Proteinkonjugate von fluorierten Farbstoffen

**[0094]** Eine Reihe von Farbstoffkonjugaten von Anti-Maus-IgG von Ziegen oder Streptavidin werden unter Verwendung von Verbindung 64, Verbindung 61, 9-(4-Carboxy-2-sulphophenyl)-2,7-difluor-6-hydroxy-3H-xanthen-3-on, Succinimidylester (Verbindung 109) und Fluoresceinisothiocyanat wie folgt getrennt hergestellt: Eine Lösung des gewünschten Proteins wird zu 10 mg/ml in 0,1 M Natriumbicarbonat hergestellt. Die Markierungsreagentien werden zu 10 mg/ml in DMF gelöst. Vorbestimmte Mengen der Markierungsreagentien werden den Proteinlösungen unter Rühren langsam zugegeben. Ein Molverhältnis von 10 Äquiv. Farbstoff zu 1 Äquiv. Protein ist typisch, obwohl die optimale Menge mit dem jeweiligen Markierungsreagens und dem Protein, das markiert wird, variiert. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur eine Stunde lang oder auf Eis für mehrere Stunden inkubiert. Das Farbstoff-Protein-Konjugat wird auf CELLUFINE GH-25, ausgeglichen mit PBS, von anderen Reagentien abgetrennt. Das ursprüngliche proteinhaltige gefärbte Band wird aufgefangen, und der Markierungsgrad wird durch die Absorption am Absorptionsmaximum jedes Fluorophors, unter Anwendung des Extinktionskoeffizienten von  $68.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  für das Fluorescein bei pH 8 und von  $70.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  für die anderen drei fluorierten Fluorophore bei ihren Absorptionsmaxima, bestimmt. Die Proteinkonzentration wird aus der optischen Dichte bei 280 nm, korrigiert für die Farbstoffabsorption bei derselben Wellenlänge, bestimmt.

Gesamtfluoreszenz ausgewählter Farbstoff-Protein-Konjugate als eine Funktion des Substitutionsgrades

**[0095]** Eine Reihe von Konjugaten von Anti-Maus-IgG von Ziegen wird unter Verwendung von Verbindung 64, Verbindung 61, Verbindung 109 und Fluoresceinisothiocyanat, wie oben beschrieben, hergestellt, um Derivate mit ähnlichen Substitutionsgraden zu erhalten. Die Fluoreszenz der Konjugate der fluorierten Fluoresceine ist stärker als die von FITC. Zudem erlischt die Fluoreszenz von Antikörperkonjugaten von Verbindung 59 und Verbindung 109 selbst bei hohen Substitutionsgraden nicht nennenswert, wie in [Fig. 1](#) gezeigt.

Markieren und Benutzen von Weizenkeim-Agglutinin mit 2',7'-Difluorfluorescein

**[0096]** Weizenkeim-Agglutinin (25 mg, EY Laboratories) wird in 5 ml Natriumcarbonatpuffer pH 9,0 gelöst, der 5 mM N-Acetylglucosamin enthält, um die aktive Stelle zu schützen. Dazu werden 3,5 mg der Verbindung 76 gegeben. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur wird die Lösung, wie oben für Proteinkonjugate beschrieben, gereinigt. Gefolgt von Lyophilisierung wird aus der Absorption bei 490 nm ein Substitutionsgrad von 2 bis 3 Farbstoffen pro Molekül bestimmt. Wenn das Konjugat gemäß Sizemore et al. (US-Patent Nr. 5,137,810) benutzt wird, kann es zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien unterscheiden.

Markieren von Actinfilamenten mit Verbindung 73 und Photobleichen

**[0097]** CRE-BAG-2-Fibroblasten werden mit Formaldehyd fixiert, mit Aceton permeabilisiert und dann mit den fluoreszierenden Phalloxinen Fluoresceinphalloidin und Verbindung 73 angefärbt. Die angefärbten Zellen zeigen grün fluoreszierende F-Actinfilamente. Jede Probe wird kontinuierlich belichtet und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das relative Photobleichen, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, zeigt deutlich die überlegene Lichtstabilität der fluorierten Farbstoffkonjugate.

**[0098]** Sobald die F-Actinfilamente angefärbt sind, werden optional zusätzliche Zellkomponenten unter Verwendung anderer Farbstoffkonjugate angefärbt, die spektrale Eigenschaften aufweisen, die sich leicht von denjenigen des fluorierten Farbstoffkonjugates unterscheiden lassen. Beispielsweise werden Zellkerne unter Verwendung von DAPI fluoreszierend blau angefärbt, während Zellantigene unter Verwendung eines fluoreszierenden Antikörperkonjugats eines Rhodamin- oder Carbocyaninfarbstoffes, wie z. B. des Farbstoffs TEXAS RED bzw. des Farbstoffs CY-5, rot angefärbt werden. Sowohl das Anfärben als auch die anschließende Sichtbarmachung der einzelnen Zellkomponenten können gleichzeitig oder nacheinander erfolgen.

Herstellung eines Dextronkonjugats von Verbindung 76

**[0099]** Verbindung 76 wird mit Cyanurchlorid behandelt, um das Dichlortriazinaddukt (Verbindung 110) zu ergeben, das benutzt wird, um die freien Hydroxygruppen eines Polysaccharids zu markieren.

**[0100]** Ein Dextran von MG 70.000 (50 mg) wird in 2,5 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 9,5) gelöst. Verbindung 110 (20 mg in 1 ml DMSO) wird zugegeben. Die Lösung wird 6 Stunden lang auf  $50^\circ\text{C}$  erhitzt, wobei der pH mit 1 M NaOH auf 9,5 bis 10,0 gehalten wird. Das Farbstoff-Dextran-Konjugat wird auf SEPHADEX G-15

unter Verwendung von 30 mM Ammoniumacetat gereinigt. Das erste gefärbte Band wird aufgefangen und lyophilisiert.

#### Herstellung von Aminodextrankonjugaten von fluorierten Fluoresceinen

**[0101]** Ein Aminodextran von MG 70.000 (50 mg) wird zu 10 mg/ml in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> gelöst. Verbindung 61 wird zugegeben, um ein Farbstoff/Dextran-Verhältnis von 12 zu ergeben. Nach 6 Stunden wird das Konjugat auf SEPHADEX G-50 unter Eluieren mit Wasser gereinigt und das Produkt wird lyophilisiert. Typischerweise werden ~6 Mol Farbstoff an 70.000 g Dextran konjugiert.

#### Herstellung von fluoreszierenden Liposomen

**[0102]** Fluoreszierende Liposome, die in ihrem Inneren polare Derivate, wie z. B. Verbindung 36 oder 2',7'-Difluorcalcein (hergestellt durch Hydrolyse von Verbindung 99) enthalten, werden im Wesentlichen hergestellt und benutzt wie in J. BIOL. CHEM. 257, 13892 (1982) und PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 75, 4194 (1978) beschrieben. Alternativ werden Liposome, die lipophile fluorierte Fluoresceine innerhalb ihrer Membranen enthalten, wie z. B. Verbindung 79, hergestellt durch gemeinsames Auflösen des fluoreszierenden Lipids und des unmarkierten Phospholipids oder der unmarkierten Phospholipide, die das Liposom bilden, bevor die Liposomdispersion gebildet wird, im Wesentlichen wie von Szoka, Jr. et al. (ANN. REV. BIOPHYS. BIOENG. 9, 467 (1980)) beschrieben.

#### Herstellung eines fluoreszierenden Lipoproteins von geringer Dichte

**[0103]** Kovalente Konjugate von Lipoproteinen von geringer Dichte (LDL) des Menschen, von denen bekannt ist, dass sie von Makrophagen-, Endothel- und anderen Zellen, die „Fänger“-Rezeptoren enthalten, die für das modifizierte LDL spezifisch sind, aufgenommen werden, werden unter Anwendung der Verfahren, die für das Herstellen von Proteinkonjugaten beschrieben sind, sowie Reinigung durch Gelfiltration, hergestellt. Das Binden der fluoreszierenden Konjugate kann entweder durch Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Alternativ kann LDL, das in seinem Lipidbereich markiert ist, durch Inkubation des LDL mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff, dispergiert in Puffer, gefolgt von Gelfiltration, hergestellt werden.

#### Herstellung von fluoreszierenden Konjugaten von Bakterien

**[0104]** Durch Hitze abgetötete Escherichia coli werden zu 10 mg/ml in einem Puffer von pH 8 bis 9 suspendiert und anschließend mit 0,5 bis 1,0 mg/ml eines aminreaktiven fluorierten Farbstoffes inkubiert. Nach 30 bis 60 Minuten werden die markierten Bakterien zentrifugiert und mit Puffer gewaschen, um nichtkonjugierten Farbstoff zu entfernen. Markierte Bakterien, die opsoniert sind, werden von Makrophagen aufgenommen, wie mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

#### Nützlichkeit von Proteinkonjugaten als Immunreagentien und Beständigkeit gegenüber dem Photobleichen

**[0105]** Antikörperkonjugate von Verbindung 59, Verbindung 61, Verbindung 109 und Fluorescein, Succinimidylester werden mit Substitutionsgraden von ungefähr 4 bis 6 hergestellt. INOVA-Objektträger werden in 1% Rinderserumalbumin (BSA) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) 30 Minuten lang rehydratisiert. Der Objektträger wird gründlich entwässert. Human-Auto-Antikörper werden aufgebracht, der Objektträger wird 30 Minuten inkubiert und mit PBS gespült. Anti-Mensch-Antikörper von Mäusen werden aufgebracht und der Objektträger wird 30 Minuten inkubiert und mit PBS gespült. Jedes grüne, fluoreszierende Konjugat von Anti-Maus-Antikörpern von Ziegen wird als eine Lösung von 10 µg/ml, mit 1% BSA/PBS verdünnt, aufgebracht. Nach 30 Minuten werden die markierten Objektträger in PBS, dann in 50 mM Tris pH 8,0 gespült, in 50 mM Tris pH 8,0 eingesetzt und durch ein Langpass-Fluoresceinfilter betrachtet. Alle Proben ergeben vorwiegend eine Kernanfärbung. Während 100 Sekunden wird bei kontinuierlicher Belichtung der Probe unter Verwendung eines Langpass-Fluoresceinfilters alle 5 Sekunden ein Bild des Objektträgers angefertigt. Unter Anwendung dieses Verfahrens werden drei Zellengebiete gebleicht, und die Werte des Photobleichens werden normalisiert und gemittelt. Der Mittelwert aus drei Durchgängen für jedes Konjugat wird dann normalisiert und aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind in [Fig. 2](#) gezeigt. Es wird beobachtet, dass Antikörperkonjugate der fluorierten Farbstoffe bedeutend lichtstabiler sind als die Fluoresceinkonjugate.

In-situ-Hybridisierung einer unter Verwendung von fluoreszierenden Nucleotidkonjugaten hergestellten RNA-Sonde

**[0106]** Ein UTP-Konjugat von Verbindung 72 wird unter Verwendung von 5-(3-Aminoallyl)-uridin-5'-triphosphat, Ammoniumsalz (Sigma Chemical), hergestellt.

**[0107]** Fibroblasten von Mäusen werden fixiert und unter Anwendung von Standardvorgängen zur In-situ-mRNA-Hybridisierung vorbereitet. Eine fluorophormarkierte RNA-Sonde wird vorbereitet durch In-vitro-Transkription eines Plasmids, welches das Maus-Actin-Strukturgen, stromabwärts von einem Phage-T3-RNA-Polymerasepromotor geklont, enthält. Die Markierungsreaktionen bestehen aus dem Kombinieren von 2 µl DNA-Template (1 µg DNA), jeweils 1 µl 10 mM ATP, CTP und GTP, 0,75 µl 10 mM UTP, 2,5 µl 1 mM fluoreszierendes UTP-Verbindung-72-Konjugat, 2 µl 10X-Transkriptionspuffer (400 mM Tris, pH 8,0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Spermidin, 100 mM NaCl), 1 µl T3-RNA-Polymerase (40 Einheiten/µl), 1 µl BSA von 2 mg/ml und 8,75 µl Wasser. Die Reaktionsmischungen werden bei 37°C für zwei Stunden inkubiert.

**[0108]** Das DNA-Template wird durch Behandlung der Reaktionsmischung mit 20 Einheiten DNase I für 15 Minuten bei 37°C entfernt. Das RNA-Transkript wird durch Extraktion mit einem gleichen Volumen Phenol: Chloroform 1:1, dann mittels Chromatographie durch SEPHADEX G50 gereinigt. Die markierte RNA wird 5 Minuten lang bei 50°C denaturiert, dann unter Anwendung von Standardvorgängen zu Zellpräparaten hybridisiert. Wenn die Präparate gewaschen und durch ein Fluoresceinfilter an einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden, zeigen Zellen, die Actin-mRNA exprimieren, hellgrüne Fluoreszenz.

Verwendung von Verbindung 96 zum Nachweis der Aktivität saurer Phosphatase

**[0109]** Die Rate der Erzeugung von fluoreszierendem Produkt wird durch Anregen einer Lösung von 10 µM Verbindung 96 oder Fluoresceindiphosphat (FDP) bei 490 nm gemessen, während die Emission in einem Fluorometer bei 515 nm in Gegenwart von 0,1 Einheiten prostataspezifischer saurer Phosphatase bei pH 5 überwacht wird. Unter diesen Bedingungen erzeugt die saure Phosphatase bei Verwendung von Verbindung 96 eine etwa 6,5mal größere Signaländerung als bei Verwendung von FDP.

Verwendung von Verbindung 94 zum Nachweis der Aktivität saurer β-Galactosidase

**[0110]** Die Fluoreszenz, die aus dem Einwirken saurer β-Galactosidase aus Rinderinspektionen auf Fluoresceindigalactosid (FDG) und auf Verbindung 94 entsteht, wird verglichen. Die Fluoreszenzerhöhung bei 512 nm, wenn bei 490 nm angeregt, wird gegen die Zeit für 50 µM Substrat mit 4,6 nM Enzym in Assaypuffer (200 mM Natriumphosphat + 75 mM Zitronensäure, pH 4,5) gemessen. Die anfängliche Rate der Fluoreszenzerzeugung durch Verbindung 94 ist 3mal größer als die, die unter Verwendung von FDG erhalten wird.

Markieren von Zellen mit fluorierten Fluoresceindiacetaten

**[0111]** Zellen einer Lymphoid-B-Zellkultur von Menschen in Medium RPMI 1640 werden bei 37°C 30 Minuten lang mit 1 µM von Verbindung 26 oder Fluoresceindiacetat (FDA) behandelt. Im Anschluss an das Zentrifugieren und Waschen in PBS werden die Pellets für 15 Minuten wieder im Medium RPMI 1640 suspendiert, wieder zentrifugiert, in PBS gewaschen, mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert und mittels Durchflusszytometrie unter Anwendung einer Anregung bei 488 nm analysiert. Zellen, die mit Verbindung 26 angefärbt sind, zeigen nach zwei Stunden eine bedeutend größere Fluoreszenz als diejenigen, die mit FDA angefärbt sind ([Fig. 5](#)). Die Fluoreszenz in den Zellen kann mindestens 24 Stunden lang nachgewiesen werden, und der Farbstoff überträgt sich nicht auf andere Zellen, wenn die markierten Zellen mit unmarkierten Zellen vermischt werden. Zellen, die mit 2',4',5',7'-Tetrafluorfluoresceindiacetat angefärbt sind, sind ebenfalls schwach fluoreszierend. Alternativ werden die angefärbten und gewaschenen Zellen ohne Fixierung betrachtet oder analysiert.

Löschen der Fluoreszenz von 2',7'-Difluorfluorescein durch eine polyklonale Anti-Fluorescein-IgG-(H+L)-Fraktion von Kaninchen

**[0112]** Lösungen aus  $5 \times 10^{-9}$  M Fluorescein und  $5 \times 10^{-9}$  M Verbindung 29 werden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0, hergestellt.

**[0113]** Die Fluoreszenz jeder Lösung wird mit einer Anregung bei 490 nm abgelesen. Aufeinander folgende Zugaben von 0,5 mg/ml polyklonaler Anti-Fluorescein-IgG-(H+L)-Fraktion von Kaninchen (Molecular Probes,

Inc.) werden zugegeben, und die Fluoreszenzmessungen werden wiederholt. Die Intensitäten sind in Tabelle 13 festgehalten:

Tabelle 13

Antikörper-Volumen (µl)	Intensität der Fluoreszenz	
	Fluorescein	Verbindung 29
0	100%	100%
2	84,6%	83,6%
4	68,8%	67,3%
6	54,3%	51,9%
8	38,5%	36,5%
10	22,9%	23,8%
12	11,7%	13,4%
15	4,4%	6,3%

**[0114]** Die Ergebnisse zeigen ein praktisch identisches Binden und Löschen der zwei Farbstoffe.

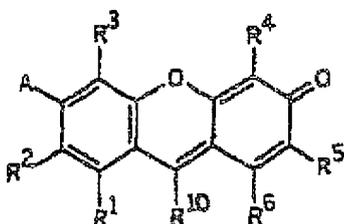
#### Arbeitsvorgang für die pH-Titration von fluorierten Fluorophoren

**[0115]** Der interessante Farbstoff wird zuerst in einer Reihe von Puffern gelöst, die alle unter Verwendung eines pH-Meters kalibriert wurden. Acetatpuffer werden typischerweise in dem Bereich von pH 4 bis 6 und Phosphatpuffer in dem Bereich von pH 6 bis 8 benutzt. Die Absorptionsmessungen werden unter Verwendung von Lösungen durchgeführt, die eine Konzentration von ungefähr 10 µM aufweisen, und die Fluoreszenzmessungen werden unter Verwendung von Lösungen durchgeführt, die eine Konzentration von ungefähr 1 µM aufweisen. Die Absorptions- oder Emissionsdaten werden dann über den pH aufgetragen, um die  $pK_s$ -Werte zu bestimmen. Beispielsweise zeigt **Fig. 3** die Fluoreszenzemissionsdaten für 2',7'-Difluorfluorescein ( $pK_s \sim 4,7$ ) und Fluorescein ( $pK_s \sim 6,4$ ), aufgetragen über den pH der Lösung. Die Daten zeigen, dass die Fluorierung des Fluorophors den  $pK_s$  des Fluoresceins bedeutend vermindert hat. Der  $pK_s$  des fluorierten Fluoresceins ist sogar kleiner als der von 2',7'-Dichlorfluorescein ( $pK_s \sim 5,1$ ).

**[0116]** Es versteht sich, dass, obwohl die vorstehende Erfindung an Hand von Abbildungen und Beispielen ausführlich beschrieben wurde, zahlreiche Modifikationen, Ersetzungen und Änderungen möglich sind, ohne den Umfang der Erfindung zu verlassen.

#### Patentansprüche

##### 1. Verbindung mit der Formel I



I

wobei

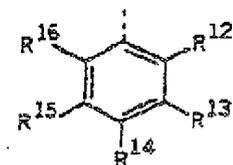
$R^1$  und  $R^6$  unabhängig H, F, Cl, Br, I,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl oder  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkoxy sind;  $R^2$  und  $R^5$  F sind;  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig H, Cl, Br, I, CN oder  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl sind, wobei jedes Alkyl optional des Weiteren mit F, Cl, Br, I, Sulfonsäure, einem Salz einer Sulfonsäure, Carbonsäure, einem Salz einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester eines  $C_1$ - $C_6$ -Alkohols, einem Carbonsäureester von  $-CH_2-O-(C=O)-R^{18}$  substituiert ist, wobei  $R^{18}$  ein  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder Amino, Alkylamino, Dialkylamino oder Alkoxy ist, deren Alkylabschnitte unabhängig 1-6 Kohlenstoffe aufweisen, oder eines oder beide von  $R^3$  und  $R^4$   $-CH_2N(CR^{19}HCOOR^{17})_2$  ist/sind, wobei  $R^{19}$  H oder ein  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl ist,  $R^{17}$  H, ein biologisch kompatibles Gegenion, ein lineares oder verzweigtes Alkyl mit 1-6 Kohlenstoffen oder  $-CH_2-O-(C=O)-R^{18}$  ist,

A OR<sup>7</sup> ist,

wobei R<sup>7</sup> unabhängig H; C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl; ein C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Acyl, das optional mit Amino, Hydroxy, Carbonsäure, einem Salz einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester eines C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkohols, einem Carbonsäureester von -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup> substituiert ist; ein Trialkylsilyl, wobei jede Alkylgruppe unabhängig 1-6 Kohlenstoffe aufweist; oder ein BLOCK ist,

wobei jede BLOCK-Gruppierung unabhängig eine einwertige Gruppierung ist, die durch das Entfernen einer Hydroxygruppe von Phosphat oder von Sulfat abgeleitet ist, oder ein biologisch kompatibles Salz davon; oder eine einwertige Gruppierung, die durch das Entfernen einer Hydroxygruppe von einer Carboxygruppe einer aliphatischen oder aromatischen Carbonsäure oder einer Aminosäure, einer geschützten Aminosäure, einem Peptid oder einem geschützten Peptid abgeleitet ist; oder eine einwertige Gruppierung, die durch das Entfernen einer Hydroxygruppe von einem Alkohol oder von einem Mono- oder Polysaccharid abgeleitet ist, wobei der BLOCK ausgewählt ist, durch die Wirkung eines Enzyms von der Verbindung entfernbar zu sein; oder der BLOCK eine photolabile, absperrende Gruppe ist;

R<sup>10</sup> F, Carbonsäure, ein Salz einer Carbonsäure, ein Carbonsäureester eines C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkohols oder ein Carbonsäureester von -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup> ist; oder R<sup>10</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, Alkenyl oder Alkynyl ist, das optional ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, Carbonsäure, einem Salz einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester eines C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkohols, einem Carbonsäureester von -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup>, einer Sulfonsäure, einem Salz einer Sulfonsäure, Amino, Alkylamino oder Dialkylamino substituiert ist, deren Alkylgruppen 1-6 Kohlenstoffe aufweisen; oder R<sup>10</sup> eine Arylgruppierung mit der Formel



ist, wobei R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> und R<sup>16</sup> unabhängig H, F, Cl, Br, I; oder Sulfonsäure, ein Salz einer Sulfonsäure, Carbonsäure, ein Salz einer Carbonsäure, ein Carbonsäureester eines C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkohols, ein Carbonsäureester von -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup>, CN, Nitro, Hydroxy, Azido, Amino, Hydrazino; oder C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylthio, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylamino, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylester, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylamido oder C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Arylamido sind, deren Alkyl- oder Arylabschnitte optional ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carbonsäure, einem Salz einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester eines C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkohols, einem Carbonsäureester von -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup>, Sulfonsäure, einem Salz einer Sulfonsäure, Amino, Alkylamino, Dialkylamino oder Alkoxy substituiert sind, deren Alkylabschnitte jeweils 1-6 Kohlenstoffe aufweisen; oder ein Paar benachbarter Substituenten R<sup>13</sup> und R<sup>14</sup>, R<sup>14</sup> und R<sup>15</sup> oder R<sup>15</sup> und R<sup>16</sup>, wenn sie kombiniert werden, einen fusionierten 6-gliedrigen aromatischen Ring bilden, der optional des Weiteren mit Carbonsäure, einem Salz einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester eines C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkohols, einem Carbonsäureester von -CH<sub>2</sub>-O-(C=O)-R<sup>18</sup> substituiert ist; oder wobei zumindest eines von R<sup>7</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> und R<sup>16</sup> -L-R<sub>x</sub> oder -L-S<sub>c</sub> ist, wobei jeder von -L-R<sub>x</sub> und/oder -L-S<sub>c</sub> gleich oder verschieden ist; und

L eine kovalente Einfachbindung ist oder L eine kovalente Verknüpfung mit 1-24 Nichtwasserstoffatomen ist, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus C, N, O und S besteht und aus einer beliebigen Kombination von Einfach-, Doppel-, Dreifach- oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, Stickstoff-Stickstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen und Kohlenstoff-Schwefel-Bindungen besteht;

R<sub>x</sub> eine reaktionsfähige Stelle ist; und

S<sub>c</sub> eine konjugierte Substanz ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei zumindest eines von R<sup>7</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup>, R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup> und R<sup>16</sup> -L-R<sub>x</sub> ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei R<sub>x</sub> eine Acrylamidgruppe, eine aktivierte Estergruppe einer Carbonsäure, eine Acylazid-, eine Acylhalogenid-, eine Acylnitril-, eine Hydroxy-, eine Aldehyd-, eine Alkylhalogenid-, eine Sulfonat-, eine Amin-, eine Anhydrid-, eine Anilin-, eine Arylhalogenid-, eine Azid-, eine Aziridin-, eine Boronat-, eine Carbonsäure-, eine Carbodiimid-, eine Diazoalkan-, eine Epoxid-, eine Glycol-, eine Halogenacetamid-, eine Halogentriazin-, eine Hydrazin-, eine Hydroxylamin-, eine Imidoester-, eine Isocyanat-, eine Isothiocyanat-, eine Keton-, eine Maleimid-, eine Phosphoramidit-, eine Silylhalogenid-, eine Sulfonylhalogenid- oder eine Thiolgruppe ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei L eine kovalente Einfachbindung ist und R<sub>x</sub> eine Carbonsäuregruppe, eine aktivierte Estergruppe einer Carbonsäure, eine Amin-, eine Azid-, eine Halogenacetamid-, eine Alkylhalogenid-, eine Sulfonylhalogenid-, eine Isothiocyanat- oder eine Maleimidgruppe ist.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei jedes L unabhängig 1-6 Kohlenstoffatome enthält, eine kovalente Einfachbindung ist oder das längste lineare Segment von L 4-10 Nichtwasserstoffatome, einschließlich 1-2 Heteroatomen, enthält.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei zumindest eines von  $R^7$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  -L- $S_c$  ist.

7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei entweder

(i) exakt eines von  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  -L- $R_x$  oder -L- $S_c$  ist; oder

(ii) exakt eines von  $R^7$  oder  $R^{10}$  -L- $R_x$  oder -L- $S_c$  ist.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei  $S_c$

(i) eine Aminosäure, ein Peptid, ein Protein, ein Polysaccharid, eine Ionenkomplexierende Gruppierung, ein Nucleotid, ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, ein Arzneimittel, ein Lipid, ein lipophiles Polymer, ein nichtbiologisches organisches Polymer, eine Tierzelle, eine Pflanzenzelle, ein Bakterium, eine Hefe oder ein Virus ist; oder

(ii) ein Phospholipid, ein Lipoprotein, ein Lipopolysaccharid oder Liposom ist; oder

(iii) eine Aminosäure, ein Peptid, ein Protein, ein Nucleotid, ein Oligonucleotid, eine Nucleinsäure, eine Ionenkomplexierende Gruppierung, ein Polysaccharid oder ein nichtbiologisches organisches Polymer oder polymeres Mikropartikel ist; oder

(iv) ein Antikörper, ein Antikörperfragment, ein Avidin, ein Streptavidin, ein Lectin, Protein A oder Protein G ist.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei zumindest ein  $R^7$  ein BLOCK ist.

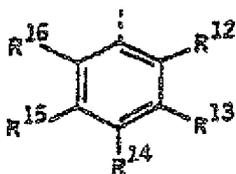
10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der BLOCK ein Ether eines Alkohols oder ein Mono- oder Polysaccharid ist.

11. Verbindung nach Anspruch 9, wobei der BLOCK eine photolabile, absperrende Gruppe ist, die eine o-Nitroarylmethin-, eine 2-Methoxy-5-nitrophenyl- oder eine Desylgruppierung ist.

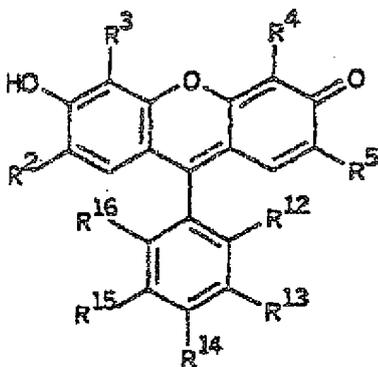
12. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei  $R^7$  der Formel I H ist.

13. Verbindung nach Anspruch 9, wobei der BLOCK ein Ester von Phosphat, Sulfat oder einer aliphatischen oder einer aromatischen Carbonsäure ist.

14. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei  $R^{10}$  die folgende Formel aufweist:



15. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, welche die folgende Formel aufweist:



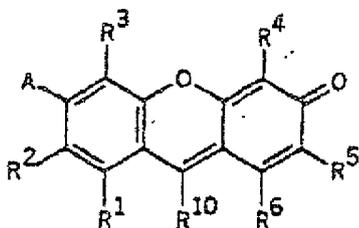
16. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei  $R^{12}$  Carbonsäure, ein Salz einer Carbonsäure, eine Sulfonsäure oder ein Salz einer Sulfonsäure ist.

17. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei zumindest drei von  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  sind.

18. Verbindung nach Anspruch 17, wobei  $R^{12}$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  F sind.

19. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei jeder der Substituenten  $R^1$ ,  $R^6$ ,  $R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$  und  $R^{16}$  entweder F oder H ist.

20. Verbindung mit der Formel



wobei

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  und A wie in Anspruch 1 definiert sind; und

exakt eines von  $R^7$  und  $R^{10}$  - $L-S_c$  ist;

wobei L eine kovalente Einfachbindung ist oder L eine kovalente Verknüpfung mit 1-24 Nichtwasserstoffatomen ist, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus C, N, O und S besteht, und aus einer beliebigen Kombination von Einfach-, Doppel-, Dreifach- oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, Stickstoff-Stickstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen und Kohlenstoff-Schwefel-Bindungen besteht; und

$S_c$  eine konjugierte Substanz ist, die eine Ionenkomplexierende Gruppierung ist.

21. Verbindung nach Anspruch 20, wobei die Ionenkomplexierende Gruppierung ein Kronenether, ein BAPTA, ein APTRA, ein Pyridin oder ein Phenanthrolin ist.

22. Verbindung nach Anspruch 21, wobei L eine kovalente Einfachbindung ist und die Ionenkomplexierende Gruppierung ein BAPTA oder ein APTRA ist.

23. Verfahren zum Anfärben einer biologischen Probe, das die folgenden Schritte aufweist:

- Herstellen einer Farbstofflösung, die eine Farbstoffverbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 22 in einer Konzentration aufweist, die ausreichend ist, um unter den gewünschten Bedingungen eine detektierbare optische Reaktion zu ergeben;
- Kombinieren der interessanten Probe mit der Farbstofflösung für einen Zeitraum, der für die Farbstoffverbindung ausreichend ist, bei Belichtung eine detektierbare optische Reaktion zu ergeben; und
- Belichten der Probe bei einer Wellenlänge, die ausgewählt ist, um die optische Reaktion hervorzurufen.

24. Verfahren zum Anfärben nach Anspruch 23, des Weiteren aufweisend:

- das Kombinieren der Probe mit einem zusätzlichen Detektionsreagens, das spektrale Eigenschaften aufweist, die nachweislich verschieden von der optischen Reaktion sind; und/oder
- den Schritt des Bestimmens eines Kennzeichens der Probe durch Vergleichen der optischen Reaktion mit einem Standard-Reaktionsparameter.

25. Verfahren zum Anfärben nach Anspruch 24, das des Weiteren das Aufspüren der Zeit oder des Ortes der optischen Reaktion innerhalb der biologischen Probe aufweist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Figure 1

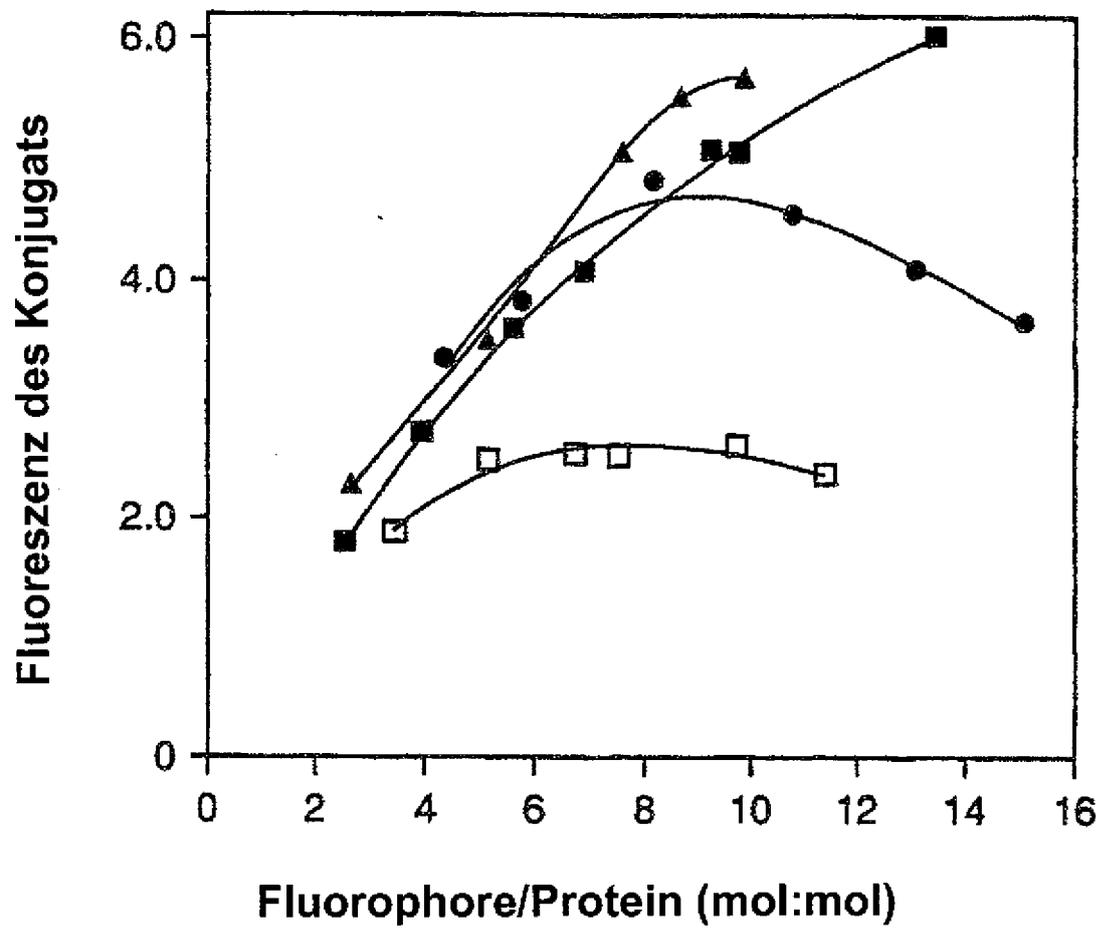


Figure 2

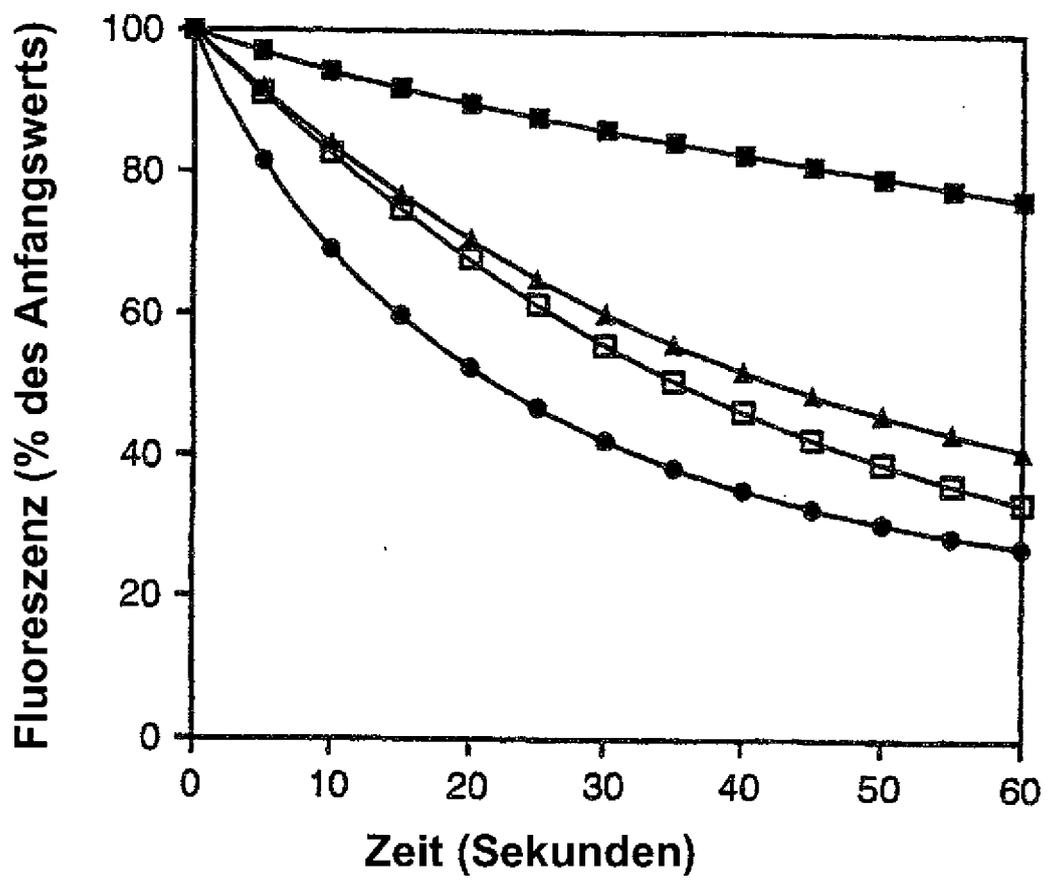


Figure 3

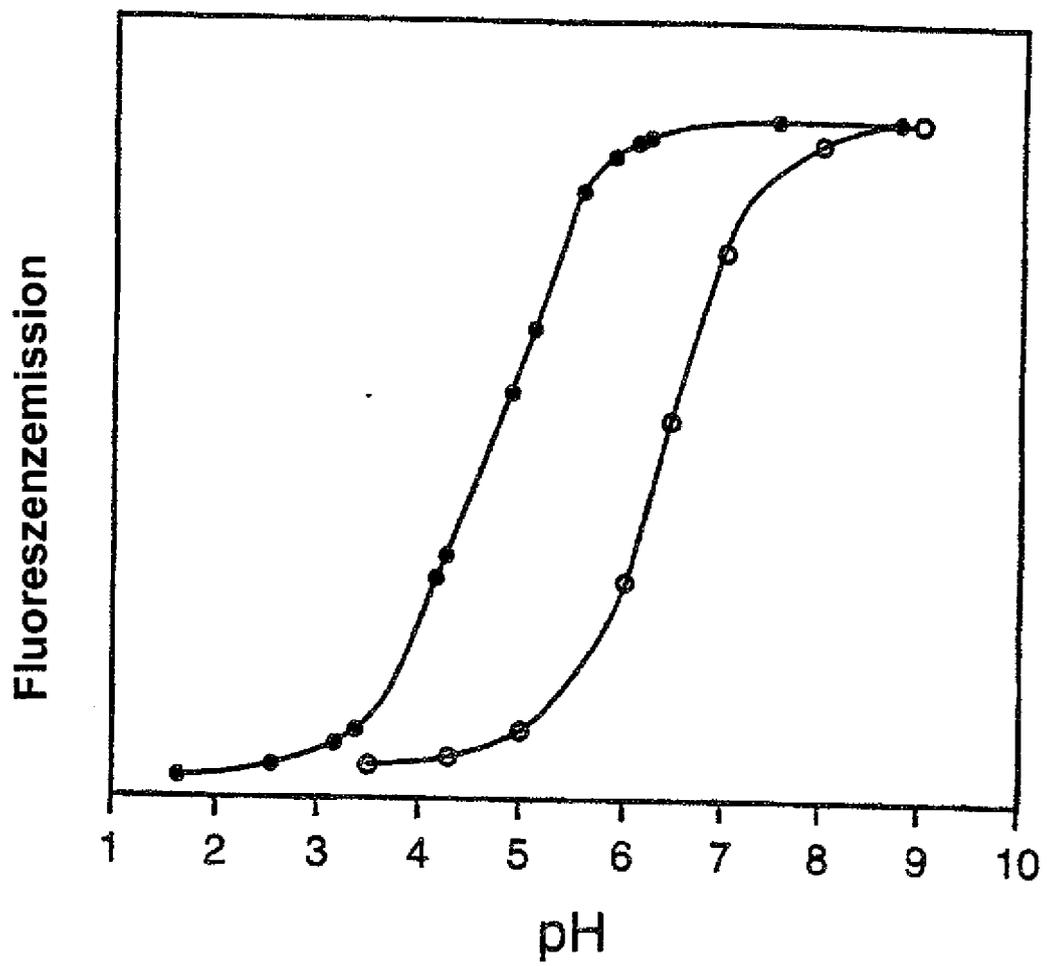


Figure 4

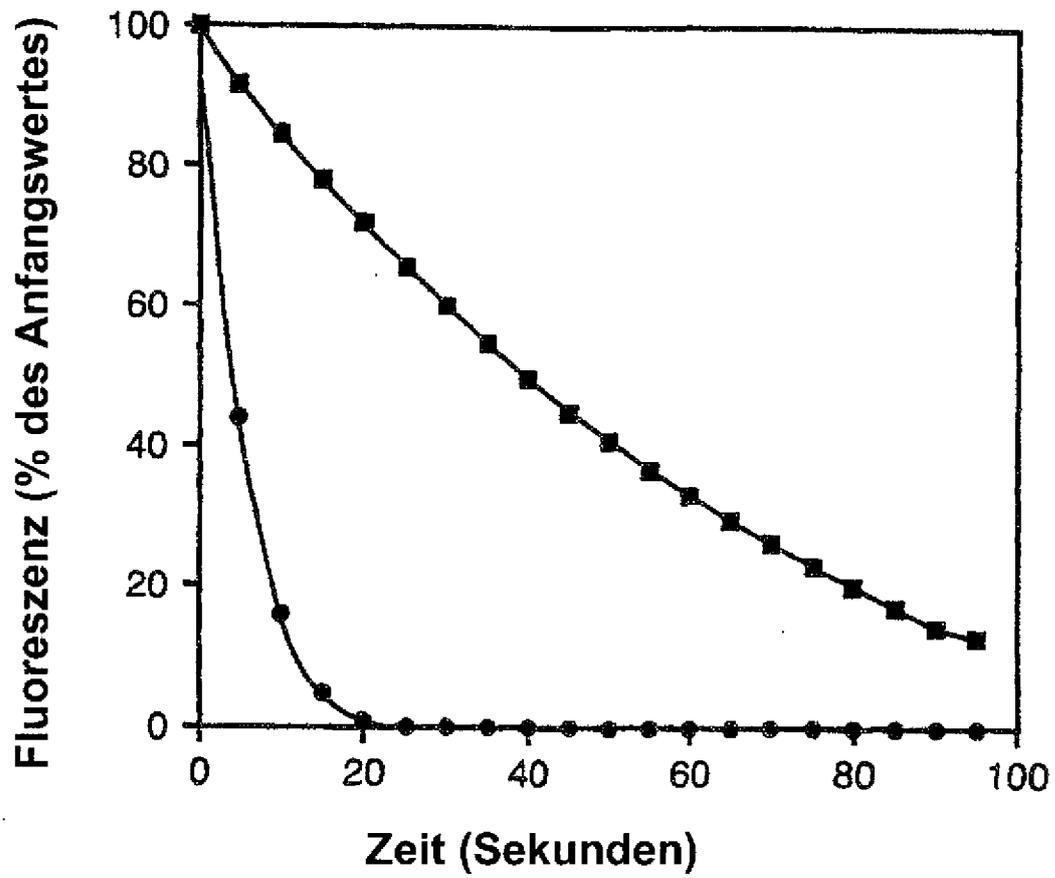


Figure 5

