



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 17 817 A1** 2004.11.04

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 17 817.1**

(22) Anmeldetag: **16.04.2003**

(43) Offenlegungstag: **04.11.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C09B 62/02**

**C09B 57/00, G01N 33/533, C09K 11/06**

(71) Anmelder:

**Chromeon GmbH, 93053 Regensburg, DE**

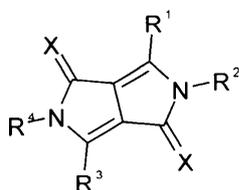
(72) Erfinder:

**Wolfbeis, Otto S., 93053 Regensburg, DE**

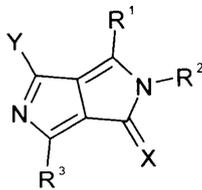
**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Pyrrolopyrrole als fluoreszente Marker für Biomoleküle und sphärische Partikel**

(57) Zusammenfassung: Es werden Pyrrolo(3,4-c)pyrrole der typischen Struktur I bzw. II beschrieben. Sie besitzen Absorptionsmaxima zwischen 400 und 650 nm und eignen sich in reaktiver Form zur fluoreszenten Anfärbung von Proteinen, Polynucleinsäuren und biologischen Rezeptoren, aber auch von Polymerartikeln. Ihre Fluoreszenz-Quantenausbeuten sind durchwegs höher als 0,5. Ebenfalls beschrieben werden entsprechend fluoreszenzmarkierte Proteine, Oligonucleotide und Partikel. Die derart angefärbten Materialien werden vorzugsweise mit violetten, blauen oder blaugrünen Leuchtdioden oder Diodenlasern zur Fluoreszenz angeregt und finden vorzugsweise Verwendung in fluoreszenz-analytischen Bestimmungsverfahren, z. B. in Immunoassays, in Hybridisierungsassays, in der Cytometrie und im pharmazeutischen Screening.



I



II

## Beschreibung

**[0001]** Die Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen spielt eine wichtige Rolle in der Bioanalytik und biologischen Forschung. Man unterscheidet zwischen Fluorophoren, die nicht-kovalent an Biomoleküle wie z. B. Proteine oder DNA binden (z. B. Interkalatoren), und solchen, die kovalent (chemisch) an Biomoleküle gebunden werden können. Einer der dafür am häufigsten verwendeten Fluorophore ist der des Fluoresceins. Er hat den Vorteil, dass er mit der 488 nm-Linie des Argon-Ionenlasers sehr wirksam angeregt werden kann, da sein Absorptionsmaximum in wässriger Lösung bei ca. 490 nm liegt. Umgekehrt hat die Verfügbarkeit von Markern aus der Gruppe der Fluoresceine dazu beigetragen, dass der Argon-Ionenlaser zu einem Standardwerkzeug der fluoreszenten Bioanalytik geworden ist.

**[0002]** Allerdings besitzen Fluoresceine zwei Nachteile, die bisher nicht behoben werden konnten: Zum einen ist ihre Fluoreszenz stark pH-abhängig, was bei unerwarteten pH-Änderungen in einer Untersuchungslösung zu fehlerhaften Messergebnissen (und damit Analysen) führt, zum anderen sind Fluoresceine relativ photolabil und bleichen unter längerer Bestrahlung deutlich aus, sodass die Fluoreszenzintensität langsam abnimmt. Auch dies führt zu fehlerhaften Ergebnissen.

**[0003]** Hier wird eine neue Gruppe von Biomarkern beschrieben, die die Vorteile einer pH-unabhängigen Fluoreszenz und einer großen Photostabilität aufweist. Die Farbstoffe haben die chemische Grundstruktur eines Pyrrolo(3,4-c)pyrrols, an welcher sich Reaktivgruppen befinden, die eine Reaktion mit Biomolekülen oder mit funktionellen Oberflächen ermöglichen. Verbindungen dieses Typs wurden wegen ihrer Schwerlöslichkeit und Unreaktivität als Farbpigmente für Autolacke eingesetzt, z. B. in Eur. Pat. 994.911 und 353.184; Eur. Pat Appl. 184.981 (1986); 184.982 (1986); sowie US-Patente 4.778.899 und 4.749.795 (1986). Die Diketo-pyrrolopyrrole wurden auch als Farbtöner (Jap. Pats. 2055-362-A, 2039-159; 3011-357) und als photoleitfähige Substanzen (EP A 353.184) vorgeschlagen, wobei deren Unlöslichkeit und Unreaktivität eine Grundvoraussetzung für deren Anwendung für die oben genannten Zwecke darstellt.

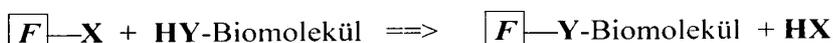
**[0004]** Biomarker müssen hingegen gut löslich sein, idealerweise in Wasser, zumindest aber in wassermischbaren Lösungsmitteln, da Biomarkierungen fast immer in wässriger Lösung durchgeführt werden. Zusätzlich (und im Gegensatz zu Farbpigmenten) müssen sie eine hohe Reaktivität (auch bei Raumtemperatur) aufweisen, da man Reaktionen mit Biomolekülen praktisch nur im Temperaturbereich zwischen 0 und 50 °C durchführen kann. Die erfindungsgemäßen Farbstoffe sind durch zum einen durch die Anwesenheit entsprechender Substituenten besser löslich, zum anderen durch die Anwesenheit entsprechender Reaktivgruppen zur Bio-konjugation geeignet. Die neuen Biomarker können in ihrer Farbe so abgestimmt werden, dass sie mit der 488 nm-Linie des Ar-Ionenlasers angeregbar sind. Insgesamt gesehen bilden die erfindungsgemäßen Pyrrolopyrrole eine Substanzklasse, welche folgende Vorteile aufweist:

- (1) Es fehlt die bei anderen Farbstoffen oft beobachtete pH-Empfindlichkeit der Farbe, zumindest im physiologischen pH-Bereich;
- (2) ihre Farbe ist durch Variation der chemischen Substituenten über einen weiten Bereich abstimmbare;
- (3) sie besitzen hohe Quantenausbeuten und immer eine gute Photostabilität;
- (4) sie sind durch die in der klinischen Analytik, in der Fließcytometrie und im Hochdurchsatz-Screening routinemäßig eingesetzten Laser mit Wellenlängen zwischen ca. 430 und 580 nm anregbar, und
- (5) sie sind schließlich so herstellbar, dass sie nur eine reaktive Gruppe tragen und somit an definierte Stellen eines Biomoleküles konjugiert werden können; die bei Vorhandensein mehrerer Reaktivgruppen oft beobachtete Quervernetzungsreaktionen unterbleiben somit.

## 2. Stand der Technik

### Biokonjugation

**[0005]** Eine Vielzahl von fluoreszenten Markern wurde bereits beschrieben. Generell handelt es sich dabei um fluoreszente Chromophore, die eine reaktive Gruppe tragen, die mit einer anderen funktionellen Gruppe eines Biomoleküls eine chemische (kovalente) Bindung eingehen. Das allgemeine Reaktionsschema einer kovalenten Markierung kann wie folgt dargestellt werden:



**[0006]** Hierin bedeutet F einen Fluorophor, an dem sich eine reaktive Gruppe X befindet, die mit einer an einem Biomolekül oder Partikel befindlichen zweiten reaktiven Gruppe HY eine chemische Reaktion eingeht. Meist wird dabei eine Gruppe vom Typ HX abgespalten. Alternativ kann man einen (Fluoreszenz)farbstoff mit

einer Biotingruppe versehen. Biotin bindet mit hoher Affinität ( $K_d$  ca.  $10^{13}$  Mol/L) an die Proteine Avidin oder Streptavidin (SA). Wenn sich das SA an einem Biomolekül befindet, kann man über die Biotin-(Strept)avidin-Bindung eine nicht-kovalente Anknüpfung von Farbstoffen an Biomoleküle erzielen. Typische Beispiele für die Gruppen X und Y sind in Tabelle 1 angegeben.

**[0007]** Tabelle 1. Reaktivgruppen (X) an synthetischen Fluorophoren, die deren Ankopplung an spezifische Gruppen (Y) von Biomolekülen oder von Polymeren ermöglichen. Daneben haben auch die in den beiden letzten Spalten angeführten Affinitätsbindungen zwischen Biotin und Strept(avidin) große Bedeutung.

X (am Fluorophor)	Y (am Biomolekül oder Partikel)	Reaktionstyp (Abgangsgruppe bzw. neue Gruppe)
-SO <sub>2</sub> Cl	-NH <sub>2</sub>	Substitution (Abspaltung von HCl)
-CO-CH <sub>2</sub> -I	-SH	Substitution (Abspaltung von HI)
-CO-CH <sub>2</sub> -Br	-COOH	Substitution (Abspaltung von HBr)
-CO-O-SUI <sup>*)</sup>	-NH <sub>2</sub> (Protein)	Substitution (Abspaltung von NHS <sup>*)</sup> )
-N=C=S	-NH <sub>2</sub> (Protein)	Addition (zu -NH-CS-NH-)
-N=C=O	-OH (Alkohol)	Addition (zu -NH-CO-O-)
R-Phosphoramidit	-OH (Desoxyribose)	kovalente Bindung (P-O)
-Maleinimid	-SH (Protein)	kovalente Addition
Pyrylium-Gruppe	-NH <sub>2</sub>	Ersatz von -O- durch >N-R im Ring
-(Strept)avidin	-Biotin	Affinitätsbindung
-Biotin	(Strept)avidin	Affinitätsbindung

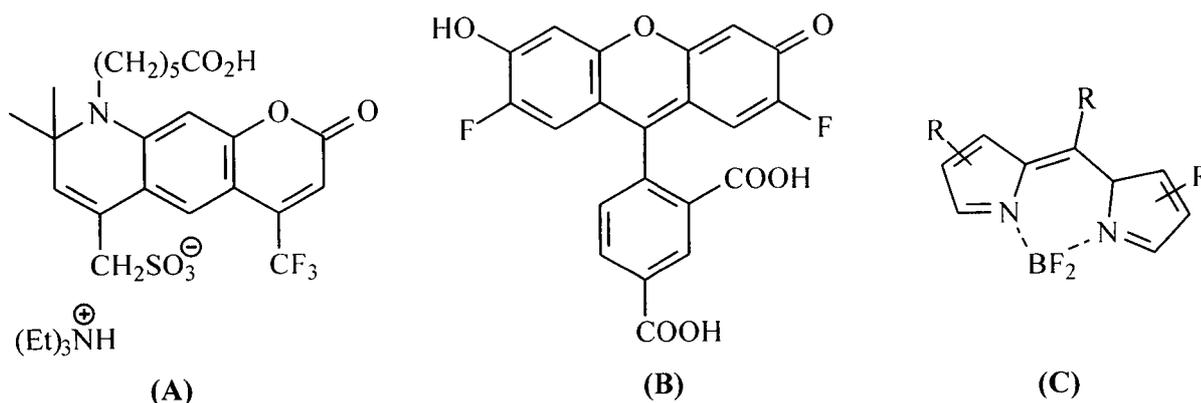
<sup>\*)</sup> SUI steht für die N-Succinimidoyl-Gruppe; NHS für das N-Hydroxysuccinimid.

**[0008]** Auf eine dieser Weisen gelingt es, einen Fluorophor F in ein Biomolekül einzuführen und dieses somit einem fluoreszenz-analytischen Verfahren zugänglich zu machen. Dazu zählen vor allem Fluoreszenzimmunoassays, ELISAs, Hybridisierungsassays, Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen, Pharma-Screening-Studien und Enzymhemmtests.

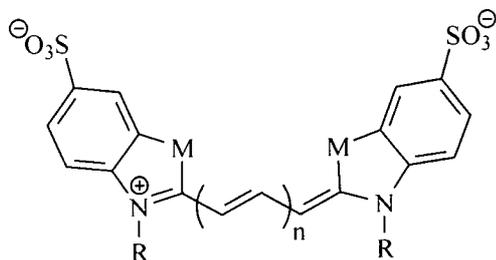
**[0009]** Polymerpartikel können über derartige Konjugationsreaktionen ebenfalls angefärbt werden, wenn sie entsprechende Gruppen (Y) tragen. Alternativ könne sie einfach mit lipophilen Farbstoffen, die sich im entsprechenden Polymer lösen, angefärbt werden.

### Fluorochrome

**[0010]** Als Fluorochrome bezeichnet man – vorzugsweise in der Bioanalytik – Fluoreszenzsysteme, die sich zur kovalenten Anfärbung von Biomolekülen eignen. Zahlreiche Fluorochrome (mit Absorptionsmaxima zwischen 300 und 900 nm) sind bekannt. Im kurzwelligen Spektralbereich sind dies vor allem die Cumarine, Fluoresceine und Bodipy-Farbstoffe. Die chemischen Strukturen eines jeweiligen Vertreters der genannten Klassen, nämlich des Alexa 430 (A), des Oregon Green (B) und eines Bodipy-Farbstoffes (C) sind weiter unten dargestellt. Die Fluoresceine und viele Cumarine sind mit dem Nachteil einer pH-abhängigen Fluoreszenz behaftet. Die Bodipy-Farbstoffe A (beschrieben in den US-PS 6.005.113, 5.433.896, 5.338.854, 5.274.113) sind in wässriger Lösung photolabil und oft hydrolytisch unbeständig.



**[0011]** Die Rhodamine bilden eine weitere Gruppe von Fluorochromen. Sie sind vom Nachteil der pH-Empfindlichkeit weitgehend frei, aber sie sind mit dem Argon-Ionenlaser nicht effizient anregbar und sie tragen am Ring immer eine positive Ladung, was unerwünschte elektrostatische Effekte verursacht. Auch die von Waggoner und Mitarbeitern in den US-PS 6.048.982, 5.627.027, 5.569.766, 5.569.587, 5.486.616, 5.268.486 beschriebenen Reaktivfarbstoffe aus der Gruppe der Cyanine der folgenden allgemeinen Struktur D:



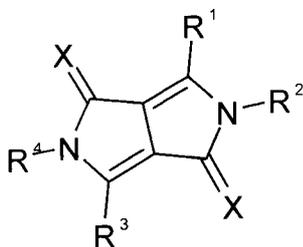
D

worin M für O, S, NR oder  $C(CH_3)_2$ , steht, und n die Werte 0 bis 3 annehmen kann, absorbieren bei weit über 500 nm, meist sogar über 600 nm, und sind ebenfalls positiv geladen.

### 3. Die neuen Farbstoffe und Marker

**[0012]** Es wird nun gefunden, dass sich Fluorophore vom allgemeinen Typ I als Biomarker eignen, wenn sie (a) durch geeignete chemische Modifikation besser löslich gemacht werden, und (b) durch Einführung reaktiver chemischer Gruppen so aktiviert werden, dass sie mit Biomolekülen in überwiegend wässriger Lösung bei Raumtemperatur (oder nur schwach erhöhter Temperatur) freiwillig eine chemische Bindungsreaktion eingehen. Die neuen Biomarker weisen Absorptionsmaxima zwischen 400 und 580 nm auf und können relativ einfach als monoreaktive Fluorochrome zur Anfärbung von Biomolekülen eignen. Im Vergleich zu den Fluoresceinen weisen sie deutlich verbesserte Photostabilität und ebensogute Quantenausbeuten auf, und ihre Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind weitgehend pH-unabhängig.

**[0013]** Die erfindungsgemäßen Reaktiv-Farbstoffe besitzen die allgemeine chemische Struktur I,



I

worin

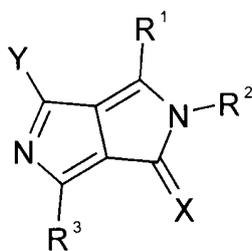
$R^1$  bis  $R^4$  für H oder einen beliebigen organischen Substituenten stehen kann, insbesondere aber für einen linearen, verzweigten, cyclischen oder ungesättigten Alkylrest, einen (Hetero)arylrest, oder einen heterocyclischen Rest, von denen jeder für sich mit einer oder mehreren Halogen-, Carboxy-, Cyano-, Hydroxy, Alkoxy, Amino- (oder substituierten Amino-), Aryl-, Heteroaryl-Sulfo- oder Phosphogruppen substituiert sein kann, wobei

$R^1$  und  $R^3$  auch für Halogen, CN, COOH, CONR<sup>1</sup>, oder COO-Alkyl stehen kann.

$R^1$  und  $R^2$  bzw.  $R^3$  und  $R^4$  über aliphatische, aromatische oder heterocyclische Ringe miteinander verbunden sein können,

X für O, S,  $C(CN)_2$ , oder N- $R^5$  steht, wobei  $R^5$  die für  $R^1 - R^4$  angegebene Bedeutung hat, und worin zumindest ein Rest  $R^1$  bis  $R^5$  eine beliebige Gruppe (einschließlich einer Biotingruppe) darstellt oder enthält, die eine kovalente Markierung oder eine Affinitätsmarkierung eines Biomoleküls oder eines Polymerpartikels ermöglicht.

**[0014]** Die erfindungsgemäßen Reaktiv-Farbstoffe besitzen des weiteren die allgemeine chemische Struktur II,



II

worin

$R^1$  bis  $R^3$  für H oder einen beliebigen anderen organischen Substituenten stehen kann, insbesondere aber für einen linearen, verzweigten, cyclischen oder ungesättigten Alkylrest, einen (Hetero)arylrest, oder einen heterocyclischen Rest, von denen jeder für sich mit einer oder mehreren Halogen-, Carboxy-, Cyano-, Hydroxy, Alkoxy, Amino- (oder substituierten Amino-), Aryl-, Heteroaryl-, Sulfo- oder Phosphogruppen substituiert sein kann, wobei

$R^1$  und  $R^2$  über aliphatische, aromatische oder heterocyclische Ringe miteinander verbunden sein können,

$R^1$  und  $R^3$  auch für Halogen, CN, COOH,  $\text{CON}(\text{R}^1)_2$  oder COO-Alkyl stehen kann,

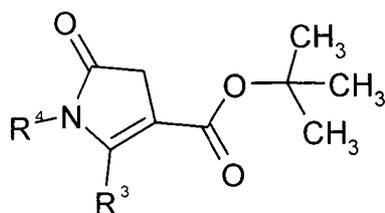
X für O, S,  $\text{C}(\text{CN})_2$ , oder  $\text{N}-\text{R}^5$  steht, wobei  $\text{R}^5$  die für  $R^1 - R^3$  angegebene Bedeutung hat,

Y für  $\text{OR}^6$ ,  $\text{SR}^6$ ,  $\text{N}(\text{R}^6)_2$ ,  $\text{OPOCl}_2$  steht, wobei  $\text{R}^6$  die für  $R^1 - R^3$  angegebene Bedeutung hat, und worin

zumindest ein Rest R oder Y eine beliebige Gruppe (einschließlich einer Biotingruppe) darstellt oder enthält, die eine kovalente Markierung oder eine Affinitätsmarkierung eines Biomoleküls oder eines Polymerpartikels ermöglicht.

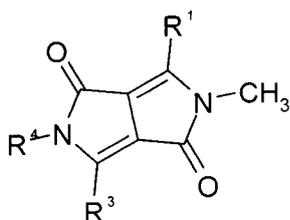
#### 4. Synthesen der Fluorophore

**[0015]** Die Synthese der Grundkörper der erfindungsgemäßen Fluorochrome kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Entsprechende allgemeine Vorschriften finden sich in den oben genannten Patentschriften und bei I. P. Lorenz et al. in Chemistry Eur. J. 8 (2002) 4047–4055 (wo Metallkomplexe von Diketo-pyrrolopyrrolen beschrieben werden), und bei C. J. H. Morton et al. in Tetrahedron 58 (2002) 5547–5565 (wo aus Diketo-pyrrolopyrrolen neue und andere Heterocyclen dargestellt werden). Von allgemeiner Bedeutung ist die Umsetzung von Bernsteinsäure-di-tert.-butylester mit einem Nitril und nachfolgender Umsetzung mit einem Amin der allgemeinen Struktur  $\text{R}^4\text{-NH}_2$  die Produkte der allgemeinen Struktur 1 entstehen. Die Verbindungen von Typ 1 (und davon abgeleitete Derivate) dienen als Ausgangsmaterial für weitere Synthesen:



1

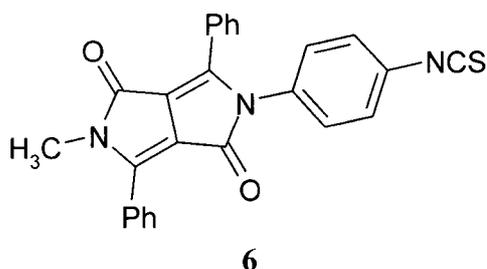
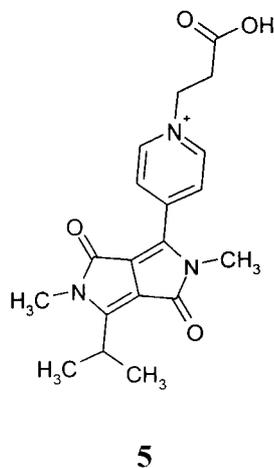
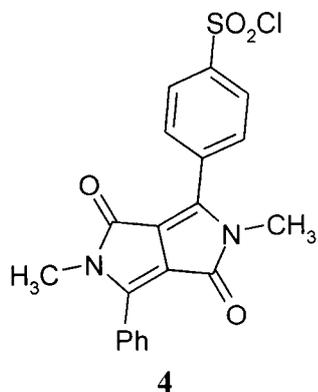
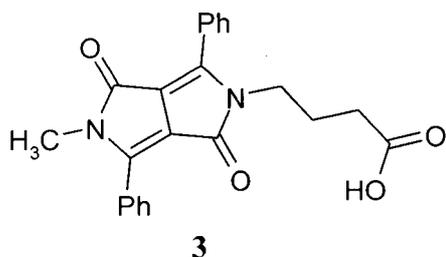
**[0016]** Durch Umsetzung von 1 (mit  $\text{R}^4 = \text{CH}_3$  und  $\text{R}^3 = \text{Phenyl}$ ) mit Benzonnitril wird z. B. das N-Methyl-1,4-Diketo-3,6-diphenyl-pyrrolo(3,4-c)pyrrol 2a erhalten, das mit rauchender Schwefelsäure zur Sulfoverbindung 2b sulfoniert und damit wasserlöslich gemacht werden kann.



**2a:**  $\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{Phenyl}$ ;  $\text{R}^4 = \text{Methyl}$

**2b:**  $\text{R}^1 = \text{R}^3 = 4\text{-Sulfophenyl}$ ;  $\text{R}^4 = \text{Methyl}$

**[0017]** Im Folgenden werden Beispiele für chemische Strukturen reaktiver Marker gegeben:

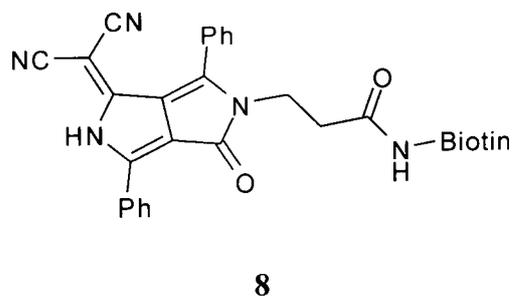
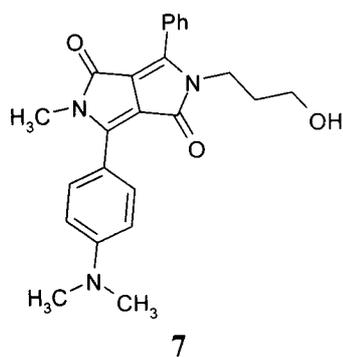


**[0018]** Die rote (und grün fluoreszierende) Verbindung 3 kann nach Aktivierung zum N-Hydroxysuccinimides-ter (NHS-Ester) direkt mit Aminogruppen zur Reaktion gebracht werden. Das tiefrote Sulfochlorid 4 stellt eine Alternative dar, bei der die Sulfogruppe die Reaktivität gegenüber Aminogruppen bewirkt. Die gelbe (und blau-grün fluoreszierende) quarternierte Verbindung 5 kann ebenfalls über einen NHS-Ester an Amine konjugiert werden. Das rote Isothiocyanat 6 reagiert mit Aminen bei Raumtemperatur unter Bildung einer Thioharnstoffbrücke im Sinne von

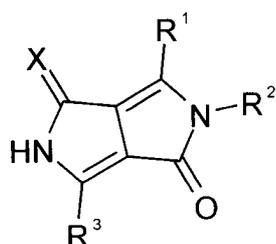


wobei FI für den Pyrrolopyrrol-Fluorophor und Pr für Protein steht.

**[0019]** Der im folgenden gezeigte rotviolette Alkohol 7 kann, wie weiter unten gezeigt werden wird, in einen Phosphoramidit-Ester überführt werden, der dann an die Ribosereste von Polynucleotiden konjugiert werden kann und somit deren Fluoreszenz-Markierung ermöglicht. Schließlich können mit Hilfe des violetten Dicyanomethylenderivates 8 über dessen Biotingruppe alle jene Biomoleküle angefärbt werden, die eine Avidin-, Streptavidin- oder Neutravidin-Gruppe besitzen, das diese zu Biotin eine außerordentlich hohe Affinität aufweisen.

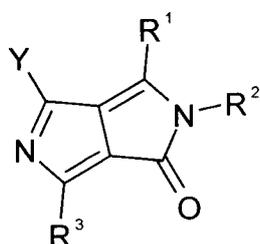


**[0020]** Die Ketogruppen in den erfindungsgemäßen Pyrrolo(3,4-c)pyrrolen können mit Lawesson-Reagens in die entsprechenden Thio-pyrrolo(3,4-c)pyrrole vom Typ 9a überführt werden:



- 9a:** X = S  
**9b:** X = N-R  
**9c:** X = C(CN)<sub>2</sub>

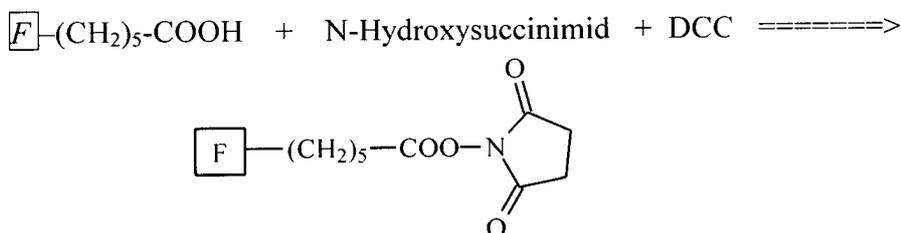
**[0021]** Deren Methylierung in Aceton mit Methyljodid in Gegenwart von Kaliumcarbonat führt zu den Thioethern 10a. Deren Umsetzung mit primären Alkylaminen oder Arylaminen führt zu den Iminen 9b, mit sekundären Aminen zu 10b, und die Umsetzung mit Malonodinitril in Ether zu den 1-Dicyanomethylen-4-keto-pyrrolo(3,4-c)pyrrolen vom Typ 9c. Diese Dicyanomethylenderivate besitzen deutlich langwelligere Absorptions- und Emissionswellenlängen.



- 10a:** Y = SEt  
**10b:** X = NR<sub>2</sub>  
**10c:** X = O-PO-Cl

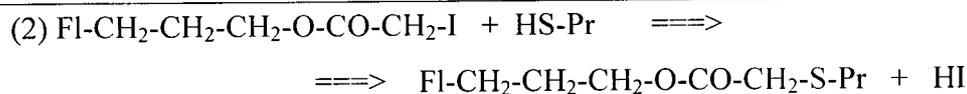
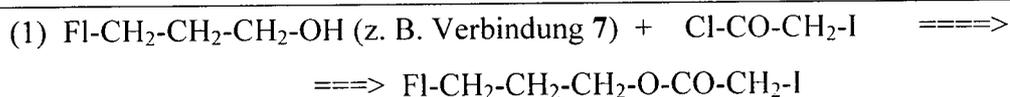
### 5. Funktionalisierung zum reaktiven Marker

**[0022]** Praktisch jede der obigen Carbonsäuren (z. B. 3 oder 5) kann zum Reaktivfarbstoff aktiviert werden, indem man sie in einem aprotischen organischen Lösungsmittel mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) nach folgendem Schema zu einem Reaktivester umsetzt:



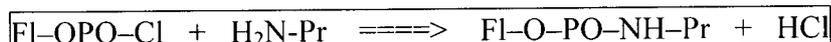
**[0023]** Hier steht F für den Pyrrolo(3,4-c)pyrrolo-Fluorophor. Verbindungen 3 und 5 wurden so umgesetzt. Aus Alkoholen (z. B. 8) erhält man wiederum durch Umsetzung mit dem Phosphin I in an sich bekannter Weise das Phosphoramidit II, das sich zur Markierung von Zuckerresten der DNA oder RNA eignet, wie dies weiter unten beschrieben werden wird.

**[0024]** Alternativ kann man aus Alkoholen durch Reaktion mit Iodacetylchlorid die entsprechenden Iodacetyl-derivate erhalten, die sich zum Anfärben von Thiolgruppen eignen:



wobei FI für den Pyrrolopyrrol-Fluorophor und Pr für Protein steht.

**[0025]** Eine besondere Form der Aktivierung besteht in der Umsetzung von Pyrrolo(3,4-c)pyrrolen vom Typ 9 (wenn R<sup>2</sup> nicht H ist) mit POCl<sub>3</sub>, die zum Phosphorylchlorid 8c führt. Derartige Phosphorsäureester reagieren im folgenden Sinn direkt mit Aminogruppen von Proteinen:



wobei wieder FI für den Pyrrolopyrrol-Fluorophor und Pr für Protein steht.

## 6. Eigenschaften der Marker

**[0026]** Die erfindungsgemäßen Pyrrolo(3,4-c)pyrrole besitzen eine deutlich verbesserte Löslichkeit in allen Lösungsmitteln, wenn keine NH-Gruppen vorliegen. Die in den oben genannten Patentschriften beziehen sich ausdem vorwiegend auf Pyrrolopyrrole mit freien NH-Gruppen, da diese wegen ihrer Schwerlöslichkeit hinsichtlich der dort beschriebenen Anwendungen besonders vorteilhaft ist.

**[0027]** Löslichkeitsverbessernde N-Alkylgruppen und N-Hydroxyalkylgruppen können schon bei der Synthese der Grundstruktur eingeführt werden, aber auch eine nachträgliche Alkylierung kann erfolgen, z. B. mit Hilfe der entsprechenden Alkylhalogenide oder Alkyltosylate und unter Zusatz eines Säurefängers wie z. B. Kaliumcarbonat, einer Aminbase oder eines Alkoholates. Die Alkylierung bewirkt zum einen eine deutliche Verbesserung der Löslichkeit der Verbindungen, was sie somit erst als Biomarker erst geeignet macht, kann aber auch gleichzeitig dazu dienen, funktionelle Gruppen einzuführen, z. B. eine Carboxygruppe, eine Hydroxygruppe, oder eine andere funktionelle oder reaktive Gruppe.

**[0028]** Die Wasserlöslichkeit der Pyrrolo(3,4-c)pyrrole kann weiter verbessert werden, wenn Sulfogruppen eingeführt werden. Dies erfolgt entweder durch Einsatz sulfonierter Benzonitrile (oder deren Ester) in der anfänglichen Synthesephase, oder durch Umsetzung von Aryl-1,4-diketopyrrolo(3,4-c)pyrrolen durch Sulfonierung mit rauchender Schwefelsäure.

**[0029]** Die Absorptionsmaximum der Marker mit R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = Alkyl liegt bei 400 – 430 nm, das der Marker mit R<sub>1</sub> = Alkyl und R<sub>2</sub> = Aryl bei 430 – 480 nm, und das der Marker mit R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = Aryl oder Heteroaryl liegt bei 460 – 580 nm. Konkret liegt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes ??? (mit Ar = Sulfophenyl) in wässriger Lösung bei 478 nm, das Fluoreszenzmaximum bei 525 nm (unkorrigiert). Im Vergleich mit Fluorescein fällt eine deutlich größere Stokes-Verschiebung (~50 nm) auf. Der molare dekadische Absorptionskoeffizient beträgt 24 000 (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Die Farbe des Markers kann durch andere Substituenten in der para-Stellung des Arylrestes, oder durch Ersatz des Aryl- durch Alkyl- oder andere Arylreste variiert werden. So liegt das Absorptionsmaximum des 1,4-Diketo-3,6-bis(4-dimethylaminophenyl)-pyrrolo(3,4-c)pyrrols schon bei 550 nm. Somit erscheint es in Lösung blauviolett. Gleichzeitig steigt die molare Absorbanz auf ca. 80 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> an.

## 7. Biokonjugation

**[0030]** Reaktivierte Carbonsäuren (vorzugsweise deren NHS-Ester) können bei Raumtemperatur in an sich bekannter Weise an primäre Aminogruppen konjugiert werden:

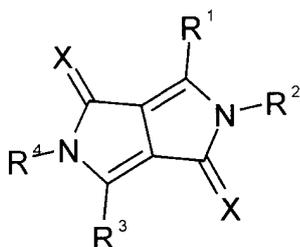


## 5.6. Herstellung eines Phosphoramidites

**[0038]** Man löst unter Argon-Atmosphäre 50 mg (145  $\mu\text{mol}$ ) des Alkohols 7 in 3 mL trockenem Dichlormethan. Dazu gibt man 47.5  $\mu\text{L}$  (166  $\mu\text{mol}$ ) 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit und 330  $\mu\text{L}$  einer gesättigten Tetrazol-Lösung in Acetonitril. Die Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann zweimal mit 5 mL einer 5%-igen  $\text{NaHCO}_3$  in Wasser und einmal mit 10 mL einer gesättigten wässrigen  $\text{NaCl}$  Lösung extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und das Produkt mittels Säulenchromatographie (reversed phase) gereinigt. Ausbeute: 33,4 mg (43%) eines rotviolett Pulvers.

## Patentansprüche

1. Fluoreszente Markerfarbstoffe mit einem Absorptionsmaximum zwischen 400 und 640 nm und der allgemeinen chemischen Struktur I



I

worin

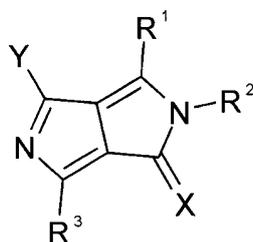
$R^1$  bis  $R^4$  für H oder einen beliebigen organischen Substituenten stehen kann, insbesondere aber für einen linearen, verzweigten, cyclischen oder ungesättigten Alkylrest, einen (Hetero)arylrest, oder einen heterocyclischen Rest, von denen jeder für sich mit einer oder mehreren Halogen-, Carboxy-, Cyano-, Hydroxy, Alkoxy, Amino- (oder substituierten Amino-), Aryl-, Heteroaryl-, Sulfo- oder Phosphogruppen substituiert sein kann, wobei

$R^1$  und  $R^3$  auch für Halogen, CN, COOH,  $\text{CONR}^1$ , oder COO-Alkyl stehen kann,

$R^1$  und  $R^2$  bzw.  $R^3$  und  $R^4$  über aliphatische, aromatische oder heterocyclische Ringe miteinander verbunden sein können,

X für O, S,  $\text{C}(\text{CN})_2$ , oder  $\text{N-R}^5$  steht, wobei  $R^5$  die für  $R^1 - R^4$  angegebene Bedeutung hat, und worin zumindest ein Rest  $R^1$  bis  $R^5$  eine beliebige Gruppe (einschließlich einer Biotingruppe) darstellt oder enthält, die eine kovalente Markierung oder eine Affinitätsmarkierung eines Biomoleküls oder eines Polymerpartikels ermöglicht.

2. Fluoreszente Markerfarbstoffe mit einem Absorptionsmaximum zwischen 400 und 650 nm und der allgemeinen chemischen Struktur II



II

worin

$R^1$  bis  $R^3$  für H oder einen beliebigen anderen organischen Substituenten stehen kann, insbesondere aber für einen linearen, verzweigten, cyclischen oder ungesättigten Alkylrest, einen (Hetero)arylrest, oder einen heterocyclischen Rest, von denen jeder für sich mit einer oder mehreren Halogen-, Carboxy-, Cyano-, Hydroxy, Alkoxy, Amino- (oder substituierten Amino-), Aryl-, Heteroaryl-, Sulfo- oder Phosphogruppen substituiert sein kann, wobei

$R^1$  und  $R^2$  über aliphatische, aromatische oder heterocyclische Ringe miteinander verbunden sein können,

$R^1$  und  $R^3$  auch für Halogen, CN, COOH,  $\text{CON}(\text{R}^1)_2$  oder COO-Alkyl stehen kann,

X für O, S,  $\text{C}(\text{CN})_2$ , oder  $\text{N-R}^5$  steht, wobei  $R^5$  die für  $R^1 - R^3$  angegebene Bedeutung hat,

Y für  $OR^6$ ,  $SR^6$ ,  $N(R^6)_2$ ,  $OPOCl_2$  steht, wobei  $R^6$  die für  $R^1 - R^3$  angegebene Bedeutung hat, und worin zumindest ein Rest R oder Y eine beliebige Gruppe (einschließlich einer Biotingruppe) darstellt oder enthält, die eine kovalente Markierung oder eine Affinitätsmarkierung eines Biomoleküls oder eines Polymerpartikels ermöglicht.

3. Markerfarbstoffe nach (1) bzw. (2), in denen mindestens einer der Substituenten  $R^1 - R^6$  einen reaktiven Ester einer Carbonsäure, ein Maleinimid, ein Haloacetyl vom Typ  $-CO-CH_2-X$ , ein Sulfochlorid, ein Chlorotriazin, eine  $-SCN$  oder  $-OCN$ -Gruppe, eine Pyryliumgruppe, ein Phosphoramidit oder ein Biotin oder Streptavidin darstellt oder enthält.

4. Markerfarbstoffe nach (1) bis (3), **dadurch gekennzeichnet**, dass das Molekül an einer beliebigen Stelle eine ionische Gruppe, insbesondere eine Sulfo-, Sulfat-, Phosphat-, Phosphonat- oder quarternierte Ammonium-Gruppe enthält, die die Löslichkeit des Markerfarbstoffes in Wasser verbessert.

5. Verwendung der Markerfarbstoffe nach Ansprüchen (1) bis (4) zur Herstellung von fluoreszent markierten Biomolekülen, insbesondere von Aminosäuren, Proteinen oder Antikörpern, von DNA, RNA oder PNA, von Pharmaka oder Zuckern, von Zellen oder Gewebsschnitten, von Rezeptoren und Liganden, sowie von markierten sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 10 nm und 10  $\mu$ m, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung über eine kovalente Bindung zwischen Marker und Biomolekül bzw. Partikel erfolgt.

6. Verwendung der Markerfarbstoffe nach Ansprüchen (1) bis (4) zur Herstellung von fluoreszent markierten Molekülen, insbesondere von Aminosäuren, Proteinen oder Antikörpern, von DNA, RNA oder PNA, von Pharmaka oder Zuckern, von Zellen oder Gewebsschnitten, von Rezeptoren und Liganden, sowie von markierten sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 10 nm und 10  $\mu$ m, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierung über eine Affinitätsbindung zwischen einem gegebenenfalls markiertem Biotin und einem gegebenenfalls markiertem Avidin, Streptavidin oder Neutravidin erfolgt.

7. Biomoleküle, insbesondere Aminosäuren, Proteinen oder Antikörper, Nucleoside, Nucleotide und Nucleinsäuren und deren Derivate und Oligomere, DNA, RNA oder PNA, Pharmaka oder Zucker, Zellen oder Gewebsschnitte, Rezeptoren oder Liganden, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einem fluoreszenten Marker nach Ansprüchen (1) bis (4) markiert sind.

8. Partikel mit einem Durchmesser zwischen 10 nm und 10  $\mu$ m, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einem fluoreszenten Marker nach Ansprüchen (1) bis (4) markiert sind.

9. Partikel nach Anspruch (8), dadurch gekennzeichnet, dass sie an ihrer Oberfläche eine zusätzliche Carboxygruppe, eine Aminogruppe, einen Biotinrest oder ein beliebiges Avidin tragen, über die die Anknüpfung an andere Biomoleküle oder Zellen ermöglicht wird.

10. Verwendung der markierten Biomoleküle nach Anspruch (7) in Bestimmungsverfahren vom Typ der Immunoassays, Hybridisierungsassays, zellulären Assays, Immunfärbung, in-situ-Hybridisierung, der Sequenzanalyse von Proteinen oder Polynucleotiden, in Affinitätsstudien einschließlich des Hochdurchsatz-Screenings bzw. in der Cytometrie.

11. Verwendung der Partikel nach Ansprüchen (8) und (9) in optischen Bestimmungsverfahren einschließlich der Immunoassays, Hybridisierungsassays, der Fließcytometrie, in Partikelsortern, in Arrays und als Marker für andere Moleküle und Zellen.

12. Verwendung der markierten Biomoleküle und Partikel nach Ansprüchen (7) – (9) in Bestimmungsverfahren, in denen die Änderung der Intensität, die Änderung der Abklingzeit, die Effizienz des Resonanz-Energietransfers der Fluoreszenz, oder das Ausmaß der Polarisierung eines Lichtstrahles bestimmt wird.

13. Verwendung der Moleküle und Partikel in Bestimmungsverfahren nach Ansprüchen (10) bis (12) unter Verwendung von Mikrotiterplatten-Geräten, von Fließcytometern, von Partikelsortern, von mikro-fluidischen Elementen oder anderen automatisierten Laborverfahren.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen