



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 26 297 T2 2007.11.15**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 322 710 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 26 297.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/30404**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 975 541.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/026891**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.09.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.04.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.07.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **24.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C09B 23/02 (2006.01)**

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

C07D 209/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

236637 P 29.09.2000 US

276870 P 16.03.2001 US

(73) Patentinhaber:

Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., US

(74) Vertreter:

Arth, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 82152

Planegg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

LEUNG, Wai-Yee, Eugene, OR 97405, US;

CHEUNG, Ching-Ying, Eugene, OR 97405, US;

YUE, Stephen, Eugene, OR 97405, US

(54) Bezeichnung: **MODIFIZIERTE CARBOCYANINFARBSTOFFE UND DEREN KONJUGATE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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 GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft Farb- und Fluoreszenzchemikalien, einschließlich reaktive Farbstoffe und Farbstoffkonjugate, sowie deren Verwendungen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Fluoreszenzverbindungen werden zur Vermittlung von Farbe und Fluoreszenz kovalent oder nicht kovalent an andere Materialien gebunden. Stark fluoreszierende Farbstoffe gestatten einen hochempfindlichen Nachweis bzw. eine hochempfindliche Lokalisierung der gebundenen Materialien. Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Carbocyaninfarbstoffe als Markierungsreagensien für verschiedene biologische Anwendungen benutzt werden können, z.B. US-Patente 4,981,977 an Southwick, et al. (1991); 5,268,486 an Waggoner et al. (1993); 5,569,587 an Waggoner (1996); 5,569,766 an Waggoner et al. (1996); 5,486,616 an Waggoner et al. (1996); 5,627,027 an Waggoner (1997); 5,808,044 an Brush, et al. (1998); 5,877,310 an Reddington, et al. (1999); 6,002,003 an Shen, et al. (1999); 6,004,536 an Leung et al. (1999); 6,008,373 an Waggoner, et al. (1999); 6,043,025 an Minden, et al. (2000); 6,127,134 an Minden, et al. (2000); 6,130,094 an Waggoner, et al. (2000); 6,133,445 an Waggoner, et al. (2000); ebenso WO97/40104, WO99/51702, WO01/21624 und EP 1 065 250 A1; und TETRAHEDRON LETTERS 41, 9185–88 (2000). Trotzdem sind viele Carbocyaninfarbstoffe dafür bekannt, daß sie gewisse Nachteile miteinander teilen, beispielsweise starkes Quenchen der Fluoreszenz von Carbocyaninfarbstoffen in Biopolymerkonjugaten, z.B. das Quenchen von Cy5- and Cy7-Farbstoffvarianten an Konjugaten, wie von Gruber et al., BIOCONJUGATE CHEM. 11,696 (2000) sowie in der EP 1 065 25 A1, 0004 erörtert. Darüber hinaus sind bestimmte gewünschte Sulfoalkylderivate der reaktiven Carbocyaninfarbstoffe schwierig herzustellen, wie für die Cy3- and Cy5-Varianten von Waggoner und Mitarbeitern in BIOCONJUGATE CHEM. 4,105,109 Sp. 2 (1993) gezeigt wurde. Ebenso besitzen Cyaninfarbstoffe eine sehr starke Neigung zur Selbstanlagerung, (d. h. Aufeinanderstapeln), was zu einer beträchtlichen Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeuten führen kann, wie in der ausführlichen Übersicht von Mishra, et al., CHEM. REV. 100, 1973 (2000) beschrieben.

[0003] Die Modifikation eines Indoliumrings des Carbocyaninfarbstoffs, um eine reaktive Gruppe oder konjugierte Substanz in 3-Stellung zuzulassen, verringert unerwarteterweise diese Probleme und führt zu Farbstoffkonjugaten, die auf Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Biopolymeren durchgehend eine wesentlich stärkere Fluoreszenz aufweisen als Konjugate, die mit strukturell ähnlichen, über das Stickstoffatom in 1-Stellung gebundenen Carbocyaninfarbstoffen markiert sind. Bestimmte erfindungsgemäße Ausführungsformen weisen neben einer intensiveren Fluoreszenzemission als strukturell ähnliche Farbstoffe bei praktisch identischen Wellenlängen sowie weniger Artefakten in ihren Absorptionsspektren nach Konjugation an Biopolymere auch eine größere Fotostabilität und eine höhere Absorption (Extinktionskoeffizienten) bei der (den) Wellenlänge(n) der maximalen Absorption auf als solche strukturell ähnliche Farbstoffe. Diese Verbesserungen führen zu einer beträchtlich größeren Empfindlichkeit in Tests, bei denen diese Farbstoffe und ihre Konjugate verwendet werden, während dabei verfügbare Filter sowie bereits im Handel erhältliche Geräte zur Verwendung mit ähnlichen Farbstoffen genutzt werden können.

[0004] Weiterhin zeigen die erfindungsgemäßen Farbstoffe typischerweise Absorptionsmaxima zwischen etwa 530 nm und etwa 800 nm, sodaß man Farbstoffe dahingehend auswählen kann, daß sie auf die Hauptemissionslinien der Quecksilberbogenlampe (546 nm), des frequenzverdoppelten Nd-Yag-Lasers (532 nm), Kr-Ionenlasers (568 nm und 647 nm), HeNe-Lasers (543 nm, 594 nm und 633 nm) oder langwelliger Laserdioden (vor allem 635 nm und länger) passen. Die erfindungsgemäßen Azacarbocyaninfarbstoffe zeigen eine bathochrome Spektralverschiebung (eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen) von ungefähr 20 bis 50 nm, bezogen auf ansonsten strukturell ähnliche, im Fachgebiet bekannte Carbocyaninfarbstoffe. Einige erfindungsgemäße Farbstoffe zeigen sehr langwellige Excitations- (mindestens 640 nm, doch bei einigen mehr als etwa 730 nm) und Emissionsbanden (mindestens 665 nm und bei einigen mehr als etwa 750 nm), sodaß diese sich insbesondere für Proben eignen, die gegenüber Infrarotwellenlängen transparent sind.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0005] **Fig. 1.** Direkter Vergleich der Absorptionseigenschaften von Verbindung 30 (Cy5-artige Verknüpfung, offene Kreise) mit Verbindung 24 (erfindungsgemäß, geschlossene Kreise) als Konjugat an GAR bei DOS-Werten von ungefähr 2,8, 4,3 und 5,5 (die Absorptionsbanden bei 600 nm steigen mit zunehmendem DOS-Wert an, und die Absorptionsbanden mit 650 nm sind auf 1,0 normiert) (siehe Beispiel 47).

[0006] **Fig. 2.** Vergleich der Fluoreszenz von Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (GAR) -Konjugaten von Verbindung 13 (durchgezogene Linie) und derjenigen des spektralähnlichen Cy3-Farbstoffs (gestrichelte Linie) (siehe Beispiel 49).

[0007] **Fig. 3.** Vergleich der Photostabilität von Verbindung 9 (gefüllte Kreise) mit Cy5 (offene Kreis), (40 x Objektiv, pH = 7,5 Lösung) (siehe Beispiel 50).

[0008] **Fig. 4.** Vergleich der Änderung in der Absorption von Verbindung 9 (geschlossene Kreise) und Cy5 (offene Kreise) nach Einbau von DNA unter Verwendung der ULS-Methodik (siehe Beispiel 58).

[0009] **Fig. 5.** Vergleich der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften identischer Konzentrationen von mit Verbindung 9 (durchgezogene Linie) bzw. Cy5 (gestrichelte Linie) markierter cDNA (siehe Beispiel 60).

KURZE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG SOWIE BESCHREIBUNG BEVORZUGTER AUSFÜHRUNGSFORMEN

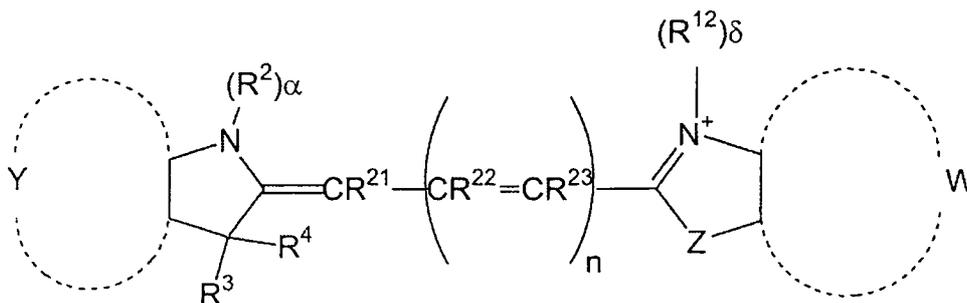
[0010] Die vorliegende Erfindung beschreibt modifizierte Carbocyaninfarbstoffe und deren Konjugate. Die Verbindungen weisen dabei wenigstens ein substituiertes Indoliumringsystem auf, wobei der Substituent am 3-Kohlenstoff des Indoliumrings eine chemisch reaktive Gruppe oder eine konjugierte Substanz enthält. Bevorzugte Verbindungen beinhalten eine Azabenzazoliumringgruppierung und wenigstens eine Sulfonatgruppierung. Die Farbstoffe und Farbstoffkonjugate werden zur Lokalisierung oder zum Nachweis der Wechselwirkung oder Gegenwart von Analyten oder Liganden in einer Probe verwendet. Kits, die solche Farbstoffe und oder Farbstoffkonjugate beinhalten, erleichtern ihre Verwendung in derartigen Verfahren.

Farbstoffe

[0011] Die erfindungsgemäßen Carbocyaninfarbstoffe umfassen typischerweise zwei heterozyklische über einen Polymethinlinker aneinandergebundene Ringsysteme gemäß der Formel: A-BRIDGE-B worin A für ein erstes heterozyklisches Ringsystem steht, bei dem es sich um einen substituierten Benzazoliumring, in dem gegebenenfalls ein oder mehrere Stickstoffatome eingebaut sind, handelt (Azabenzazoliumringe), B für ein zweites heterozyklisches Ringsystem steht, bei dem es sich um einen substituierten Benzazolium- oder Azabenzazoliumring handelt, und BRIDGE für einen Polymethinlinker steht, der gegebenenfalls substituiert ist. Das erste und zweite Ringsystem sowie der Polymethinlinker sind gegebenenfalls ferner mit verschiedenen Substituenten substituiert oder an zusätzliche Ringe kondensiert, die gegebenenfalls weiter substituiert sind. In allen erfindungsgemäßen Aspekten enthält der Carbocyaninfarbstoff eine chemisch reaktive Gruppe oder eine konjugierte Substanz, die am 3-Kohlenstoff eines Indoliumringsystems gebunden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Carbocyaninfarbstoff ferner ein- oder mehrmals mit Sulfo- oder Sulfoalkyl substituiert.

[0012] Unter "Sulfo" ist Sulfonsäure oder ein Salz der Sulfonsäure (Sulfonat) zu verstehen. In ähnlicher Weise ist unter "Carboxy" Carbonsäure oder ein Carbonsäuresalz zu verstehen. "Phosphat", wie hier verwendet, steht für einen Ester der Phosphorsäure und umfaßt Phosphatsalze. Unter "Phosphonat", wie hier verwendet, versteht man Phosphonsäure, wobei Phosphonatsalze auch umfaßt sind. Die wie hier verwendeten Alkylanteile von Substituenten wie etwa Alkyl, Alkoxy, Arylalkyl, Alkylamino, Dialkylamino, Trialkylammonium oder Perfluoralkyl sind, falls nicht anders angegeben, gegebenenfalls gesättigt, ungesättigt, linear oder verzweigt, wobei alle Alkyl-, Alkoxy-, Alkylamino- und Dialkylaminosubstituenten gegebenenfalls selbst ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind.

[0013] Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine Verbindung der Formel:



Formel X

und ihre Salze, wobei Y die zur Bildung von einem bis zwei kondensierten aromatischen Ringen mit jeweils 6 Atomen in jedem Ring notwendigen Atome darstellt, wobei die Atome ausgewählt sind aus -CH, -C, -CR¹ und -N(R²)_β, worin β jeweils gleich 0 oder 1 ist und R¹ jeweils unabhängig für -L-R_x oder für -L-S_c oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, C₂-C₁₂-Dialkylamino, jeweils gegebenenfalls weiter substituiert, steht. Zur Feinabstimmung des Absorptions- und Emissionsspektrums des erhaltenen Farbstoffs können ein oder mehrere Nicht-Wasserstoff-Substituenten an den kondensierten Ringen eingebaut werden. In einer Ausführungsform liegt wenigstens ein Nicht-Wasserstoff-Substituent, vorzugsweise Sulfo, ein Alkoxy oder Halogen vor; vorzugsweise handelt es sich bei dem Halogen um Brom.

[0014] R³ steht für -L-R_x oder -L-S_c (wie unten definiert). Die Substituenten R², R⁴, R¹², R¹³ und R¹⁴ stehen unabhängig für -L-R_x oder für -L-S_c oder für ein C₁-C₂₂-Alkyl oder C₇-C₂₂-Arylalkyl, in dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome, ausgewählt aus N, O und S, eingebaut sind und dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit Fluor, Chlor, Brom, Iod, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, oder C₂-C₁₂-Dialkylamino oder C₃-C₁₈-Trialkylammonium substituiert ist. Vorzugsweise stehen R⁴, R¹³ und R¹⁴ unabhängig für Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit Fluor, Chlor, Brom, Iod, Hydroxy, Carboxy, Sulfo oder Amino substituiert; stärker bevorzugt stehen R⁴, R¹³ und R¹⁴ für Methyl oder Ethyl. In einem erfindungsgemäßen Aspekt stehen R⁴, R¹³ und R¹⁴ für Methyl. Als Alternative bildet R⁴ zusammengenommen mit R²¹ einen gegebenenfalls mit Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen substituierten 6-gliedrigen Ring, oder R⁴ bildet zusammengenommen mit R³ einen gesättigten oder ungesättigten, mit -L-R_x oder -L-S_c substituierten Ring. Gleichfalls vervollständigen R¹³ und R¹⁴ zusammengenommen gegebenenfalls einen 5- oder 6-gliedrigen gesättigten oder ungesättigten, gegebenenfalls mit -L-R_x oder -L-S_c substituierten Ring, oder R¹⁴ bildet zusammengenommen mit einem der R²³-Reste einen gegebenenfalls mit Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen substituierten 6-gliedrigen Ring.

[0015] Vorzugsweise stehen R² und R¹² unabhängig für Alkyl mit 1–6 unsubstituierten oder einfach mit Hydroxy, Sulfo, Carboxy oder Amino substituierten Kohlenstoffatomen. Dort, wo entweder R² oder R¹² mit Hydroxy, Sulfo, Carboxy oder Amino substituiert ist, ist der Substituent vorzugsweise von dem Stickstoffatom des Indoliums oder eines anderen Benzazoliums durch 2–6 Kohlenstoffatome getrennt. Dort, wo R² und R¹² für unsubstituierte Alkylgruppen stehen, handelt es sich bei diesen vorzugsweise um Methyl oder Ethyl, am stärksten bevorzugt um Methyl. R² und R¹² sind typischerweise identisch und stehen dabei für Methyl, Ethyl, Sulfopropyl oder Sulfobutyl.

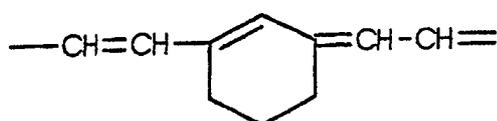
[0016] In ähnlicher Weise stellt W die zur Bildung von einem bis zwei kondensierten aromatischen Ringen mit jeweils 6 Atomen in jedem Ring notwendigen Atome dar, wobei die Atome ausgewählt sind aus -CH, -C, -CR¹¹ und -N(R¹²)_{β'}, worin β' jeweils gleich 0 oder 1 ist und R¹¹ jeweils unabhängig für -L-R_x oder -L-S_c oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, C₂-C₁₂-Dialkylamino, wobei diese jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind, steht. Bilden die sechsgliedrigen Ringe ein Azabenzazolringsystem, so sind darin typischerweise 1–3 Stickstoffatome, stärker bevorzugt 1–2 Stickstoffatome, enthalten, die typischerweise im ersten 6-gliedrigen, an den Azolring kondensierten aromatischen Ring eingebaut sind. In einem erfindungsgemäßen Aspekt enthält das Ringsystem W nur Kohlenstoffatome, wobei es sich um ein Benzazolringsystem handelt.

[0017] Handelt es sich bei A oder B um ein Azabenzazolium, so enthält dessen kondensierter aromatischer Ring bzw. enthalten dessen kondensierte aromatische Ringe typischerweise 1–3 Stickstoffatome, stärker bevorzugt 1–2 Stickstoffatome, die typischerweise im ersten 6-gliedrigen, an den Azolring kondensierten aromatischen Ring eingebaut sind. Zu bevorzugten Ausführungsformen der Azabenzazolgruppierung gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, die folgenden Strukturen (sowie dort, wo der Stickstoff durch R¹² quaternisiert ist, die äquivalenten Strukturen), worin X -CR³R⁴ entspricht:

zugten Aspekt der Azacarbocyaninfarbstoffe ist $n = 2$.

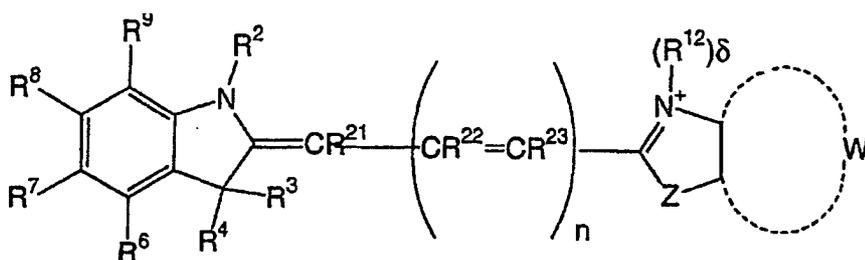
[0022] R^{21} , R^{22} und R^{23} , wenn vorhanden, stehen jeweils unabhängig für H, F, Cl, Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Aryloxy, eine N-heteroaromatische Gruppierung oder ein Iminiumion. Als Alternative bilden zwei benachbarte Substituenten zusammengenommen einen 4-, 5- oder 6-gliedrigen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffring, der entweder unsubstituiert oder gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit einem gesättigten oder ungesättigten Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Halogen oder einem Carbonylsauerstoff substituiert ist. In noch einer weiteren Ausführungsform bildet R^{21} zusammen mit R^4 einen gegebenenfalls mit Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen substituierten 6-gliedrigen Ring. Als Alternative bildet der zu Z benachbarte Methinsubstituent zusammengenommen mit einem der Reste R^{13} und R^{14} einen mit Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen gegebenenfalls substituierten 6-gliedrigen Ring.

[0023] Typischerweise stehen R^{21} , R^{22} und R^{23} jeweils für H. Handelt es sich bei einem der Reste R^{21} , R^{22} und R^{23} nicht um Wasserstoff, so ist dies typischerweise der Substituent am zentralen Kohlenstoffatom von BRIDGE. In ähnlicher Weise befindet sich dort, wo BRIDGE einen 4-, 5- oder 6-gliedrigen Ring beinhaltet, dieser typischerweise im Zentrum der BRIDGE-Gruppierung, wie beispielsweise unten für einem Heptamethin-farbstoff gezeigt:



Formel IX

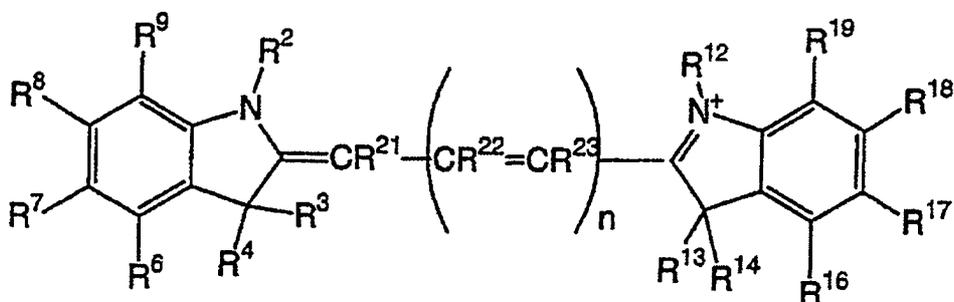
[0024] Eine bevorzugte erfindungsgemäße Version besitzt die Formel:



Formel XI

[0025] Dabei sind die Substituenten R^6 - R^9 unabhängig ausgewählt aus H, Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Amino, Alkylamino mit 1–6 Kohlenstoffatomen oder Dialkylamino mit 2–12 Kohlenstoffatomen, Sulfo, Carboxy, Perfluoralkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen oder Halogen.

[0026] In einem erfindungsgemäßen Aspekt handelt es sich sowohl bei A als auch bei B um Benzazoliumringe gemäß der Formel:

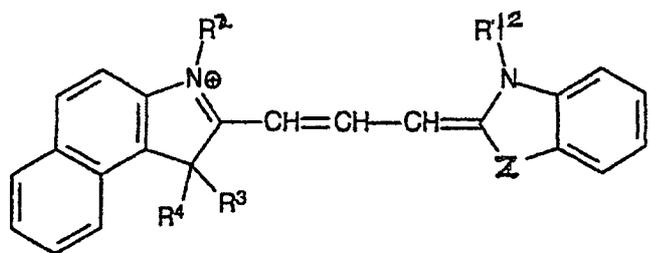


Formle XXI

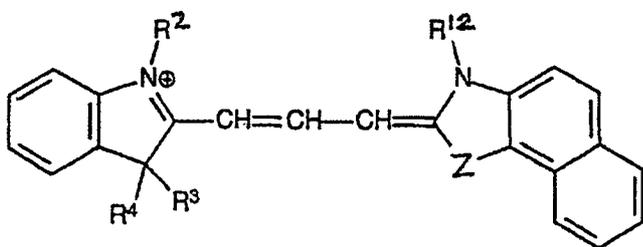
worin die Substituenten R^{16} - R^{19} unabhängig ausgewählt sind aus H, Alkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit 1–6 Kohlenstoffatomen, Amino, Alkylamino mit 1–6 Kohlenstoffatomen oder Dialkylamino mit 2–12 Kohlenstoffatomen, Sulfo, Carboxy, Perfluoralkyl mit 1–6 Kohlenstoffatomen oder Halogen.

[0027] Der Einbau eines oder mehrerer Nicht-Wasserstoff-Substituenten an einen der oder beide Benzazolumringe eignet sich zur Feinabstimmung des Absorptions- und Emissionsspektrums. Dabei liegt an jedem der Benzazolumringe typischerweise wenigstens ein Nicht-Wasserstoff-Substituent vor, vorzugsweise Sulfo, ein Alkoxy- oder ein Halogensubstituent. Bei den Benzazolumfarbstoffen handelt es sich bei den Substituenten an den Benzoringen typischerweise um H oder Sulfo. In einer Ausführungsform steht einer der Reste R⁶, R⁷, R⁸ und R⁹ bzw. der Reste R¹⁶, R¹⁷, R¹⁸ und R¹⁹ für ein Dialkylamino, bei dem es sich um einen gesättigten 5- oder 6-gliedrigen Stickstoff-Heterozyklus, wie z.B. Piperidin, handelt. Darüber hinaus bilden zwei beliebige benachbarte Substituenten R⁶-R⁹ gegebenenfalls zusammengenommen einen oder mehrere kondensierte aromatische Ringe. Diese zusätzlichen Ringe sind gegebenenfalls weiter substituiert, wie oben für R⁶-R⁹ und R¹⁶-R¹⁹ beschrieben, insbesondere mit Sulfonsäuren.

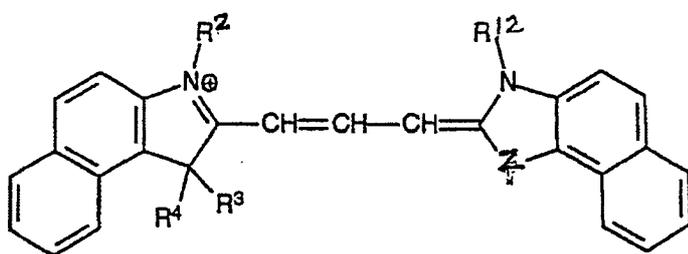
[0028] Ausgewählte Beispiele für erfindungsgemäße Carbocyaninfarbstoffe, die zusätzliche kondensierte aromatische Ringe besitzen, sind unten angegeben (der Einfachheit halber sind mit Ausnahme von wenigen Substituenten alle möglichen Substituenten als Wasserstoff dargestellt, und zwar mit der kürzesten Polymethinbrücke):



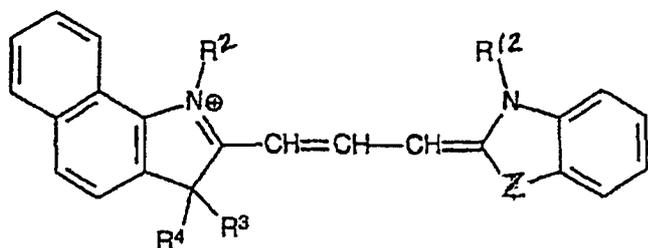
Formel XII



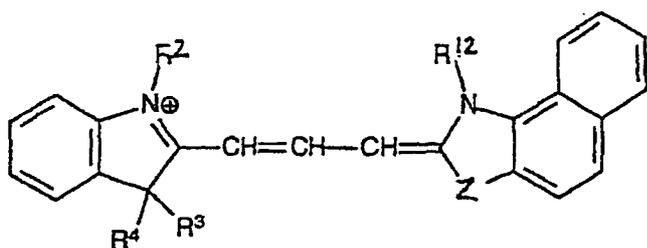
Formel XIII



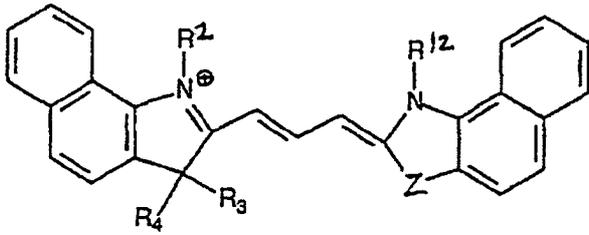
Formel XIV



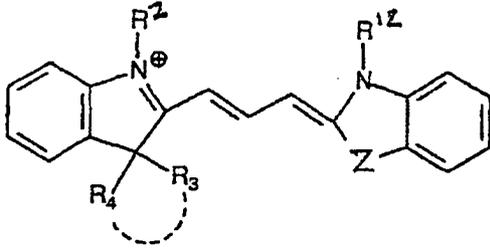
Formel XV



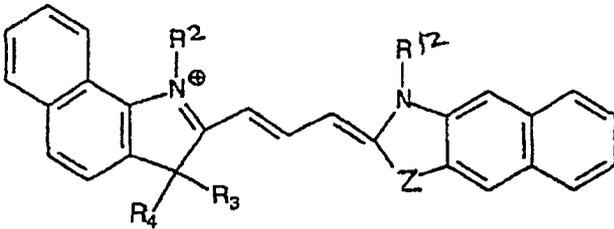
Formel XVI



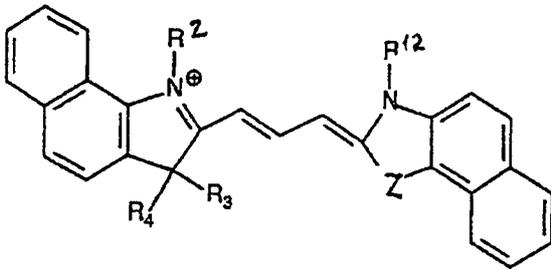
Formel XVII



Formel XVIII



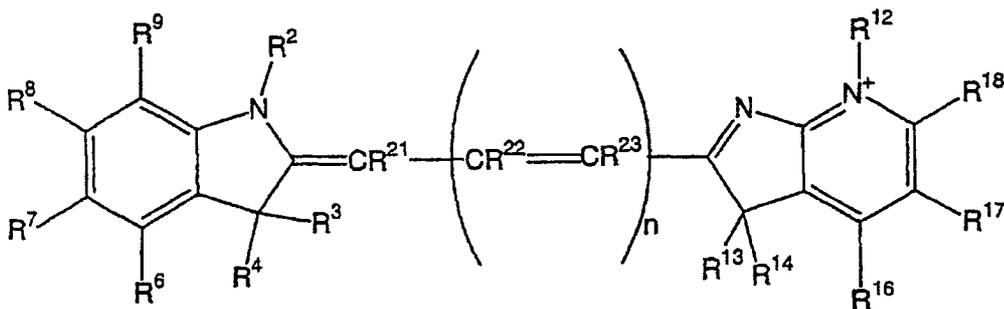
Formel XIX



Formel XX

[0029] Diese Grundstrukturen und ihre längerwelligeren Analogen sind gegebenenfalls weiter wie in diesem Abschnitt beschrieben substituiert. Zusätzliche Varianten, die nicht spezifisch oben dargestellt sind, liegen ebenso im Rahmen der Erfindung, beispielsweise das "linkshändige" Indolium der Formel XVIII, das mit einem Benzazolum der Formel XVII, XIX oder XX verknüpft ist.

[0030] In einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt steht A für ein Benzazolum und B für ein Azabenzazolum gemäß der Formel:



Formel XXII

worin die Substituenten R^6 - R^9 sowie R^{16} - R^{19} wie zuvor beschrieben sind. Bevorzugte Substituenten für R^{16} bis R^{18} sind unabhängig H, $-L-R_x$ oder $-L-S_c$ oder Amino, Trifluormethyl oder Halogen oder C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, die jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind. Vorzugsweise handelt es sich bei dem einzigen Nicht-Wasserstoff-Substituenten auf der B-Seite, falls vorhanden, um ein Brom, vorzugsweise an R^{17} . Vorzugsweise ist $n = 2$.

[0031] In einem erfindungsgemäßen Aspekt sind die erfindungsgemäßen Carbocyaninfarbstoffe ein- oder mehrfach sulfoniert. Falls der erfindungsgemäße Farbstoff mit Sulfo substituiert ist, so ist er typischerweise an R^7 oder/und R^{17} sulfoniert oder an R^2 oder/und R^{12} sulfoalkyliert oder ist sowohl sulfoniert als auch sulfoalkyliert. Typischerweise ist dort, wo der aromatische Ring von Y oder W ein oder mehrere Stickstoffatome enthält, dieser Ring nicht sulfoniert. Im allgemeinen sind im Handel erhältliche reaktive Carbocyaninfarbstoffe bis zu dreimal (an R^7 und R^{17} entsprechenden Stellungen sowie als Sulfoalkyl an einem der Reste R^2 und R^{12}) sulfoniert, wobei einer der Reste R^2 und R^{12} für die Lokalisierung der reaktiven Gruppe übrig bleibt. Im Gegensatz dazu können durch Anbindung der reaktiven Gruppe (oder der konjugierten Substanz) an R^3 bestimmte erfindungsgemäße Carbocyaninfarbstoffe wenigstens viermal (an R^7 , an R^{17} sowie als Sulfoalkyl an R^2 und R^{12}) sulfoniert sein. Diese zusätzliche Sulfonierung führt ebenso wie die Änderung der Anbindungsstelle zu reaktiven Farbstoffen und Farbstoffkonjugaten, die heller, besser löslich in wäßrigen Lösungen sowie resistenter gegen das von Farbstoff-Farbstoff-Stapelwechselwirkungen herrührende Fluoreszenzquenchen sind. Allerdings benötigen die erfindungsgemäßen Farbstoffe keine Sulfonierung mit vier oder mehr Sulfonsäuren, um bessere Spektraleigenschaften als die strukturell ähnlicher Farbstoffe, die nicht über die 3-Stellung des Indoliumrings verknüpft sind, aufzuweisen ([Fig. 4](#)).

[0032] Die Gruppierungen $-L-R_x$ oder $-L-S_c$ sind an den Farbstoff an einem R^2 , R^3 , R^4 , R^{12} , R^{13} oder R^{14} gebunden. Dabei steht in einer Ausführungsform einer oder beide Reste R^2 und R^{12} für $-L-R_x$ oder $-L-S_c$. In noch einer weiteren bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform stehen einer oder mehrere der Reste R^3 , R^4 , R^{13} und R^{14} für $-L-R_x$ oder $-L-S_c$. Als Alternative stehen einer oder mehrere der Reste R^{21} , R^{22} und R^{23} für $-L-R_x$ oder $-L-S_c$. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Farbstoff nur mit einem $-L-R_x$ oder $-L-S_c$ substituiert. R^3 steht immer für $-L-R_x$ oder $-L-S_c$.

[0033] Viele Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verbindungen besitzen eine elektronische Gesamtladung. Es versteht sich, daß, wenn das Vorhandensein derartiger elektronischer Ladungen angezeigt wird, diese durch das Vorhandensein eines entsprechenden Gegenions, das gegebenenfalls ausdrücklich identifiziert sein kann, abgeglichen werden. Ein biologisch kompatibles Gegenion, das bei einigen Anwendungen bevorzugt ist, ist bei biologischen Anwendungen nicht toxisch und besitzt keine stark schädigende Wirkung auf Biomoleküle. Ist die erfindungsgemäße Verbindung positiv geladen, so ist das Gegenion typischerweise ausgewählt aus, ohne darauf beschränkt zu sein, Chlorid, Bromid, Iodid, Sulfat, Alkansulfonat, Arylsulfonat, Phosphat, Perchlorat, Tetrafluorborat, Tetraarylborid, Nitrat sowie Anionen aromatischer oder aliphatischer Carbonsäuren. Ist die erfindungsgemäße Verbindung negativ geladen, so ist das Gegenion typischerweise ausgewählt aus, ohne darauf beschränkt zu sein, Alkalimetallionen, Erdalkalimetallionen, Übergangsmetallionen, Ammonium- oder substituierten Ammonium- oder Pyridiniumionen. Vorzugsweise sind alle benötigten Gegenionen biologisch kompatibel, bei ihrer Verwendung nicht toxisch und weisen keine stark schädigende Wirkung auf Biomoleküle auf. Gegenionen lassen sich leicht mit im Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren, wie beispielsweise Ionenaustauschchromatographie oder selektive Fällung, wechseln.

[0034] Es versteht sich, daß die erfindungsgemäßen Farbstoffe in einer oder einer anderen bestimmten elektronischen Resonanzstruktur gezeichnet wurden. Alle Aspekte der vorliegenden Erfindung gelten gleichermaßen für Farbstoffe, die formal mit anderen erlaubten Resonanzstrukturen gezeichnet wurden, da die elektronische Ladung auf den betreffenden Farbstoffen über den gesamten Farbstoff selbst delokalisiert ist.

Tabelle 1. Spektraleigenschaften. ausgewählter erfindungsgemäßer Farbstoffe

Verbindung Nr.	Excitation (nm, MeOH)	Emission (nm, MeOH)	Quantenaus- beute† (MeOH)
63	665	694	0,55
64	653	695	0,15
65	664	693	0,4
66	686	706	0,35
68	664	696	0,4
70	570	592	0,44
72	663	694	0,42
73	664	697	0,48
76	685	705	0,46
81	750	800	0,12

† Relativ zu Nilblau in Ethanol und CY5-Farbstoff in Methanol

Konjugate reaktiver Farbstoffe

[0035] In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform enthält der Farbstoff wenigstens eine Gruppe $-L-R_x$, worin R_x für die reaktive Gruppe steht, die an den Farbstoff über eine kovalente Verknüpfung L gebunden ist. In bestimmten Ausführungsformen enthält die den Farbstoff an R_x bindende kovalente Verknüpfung mehrere Zwischenatome, die als Abstandhalter dienen. Die Farbstoffe mit einer reaktiven Gruppe (R_x) markieren viele verschiedene organische oder anorganische Substanzen, die funktionelle Gruppen mit geeigneter Reaktivität enthalten oder dahingehend modifiziert sind, was zu einer chemischen Anbindung der konjugierten Substanz (S_c), dargestellt durch $-L-S_c$, führt. "Reaktive Gruppe", wie hier verwendet, bedeutet eine Gruppierung an der Verbindung, die zur chemischen Reaktion mit einer funktionellen Gruppe an einer anderen Verbindung unter Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung fähig ist. Typischerweise handelt es sich bei der reaktiven Gruppe um ein Elektrophil oder Nukleophil, das eine kovalente Verknüpfung ausbilden kann, wenn es der entsprechenden funktionellen Gruppe, bei der es sich um ein Nukleophil bzw. Elektrophil handelt, ausgesetzt wird. Als Alternative handelt es sich bei der reaktiven Gruppe um eine photoaktivierbare Gruppe, die nur nach Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge chemisch reaktiv wird. Typischerweise führt die Konjugationsreaktion zwischen dem reaktiven Farbstoff und der zu konjugierenden Substanz dazu, daß ein oder mehrere Atome der reaktiven Gruppe R_x in eine neue Verknüpfung L, die den Farbstoff an die konjugierte Substanz S_c bindet, eingebaut werden. Ausgewählte Beispiele für reaktive Gruppen und Verknüpfungen sind in der Tabelle 2 gezeigt, wobei die Reaktion einer elektrophilen Gruppe und einer nukleophilen Gruppe eine kovalente Verknüpfung ergibt.

Tabelle 2: Beispiele einiger Wege zu geeigneten kovalenten Verknüpfungen

Elektrophile Gruppe	Nukleophile Gruppe	Resultierende kovalente Verknüpfung
aktivierte Ester*	Amine/Aniline	Carboxamide
Acrylamide	Thiole	Thioether
Acylazide**	Amine/Aniline	Carboxamide
Acylhalogenide	Amine/Aniline	Carboxamide
Acylhalogenide	Alkohole/Phenole	Ester
Acynitrile	Alkohole/Phenole	Ester
Acynitrile	Amine/Aniline	Carboxamide
Aldehyde	Amine/Aniline	Imine
Aldehyde oder Ketone	Hydrazine	Hydrazone
Aldehyde oder Ketone	Hydroxylamine	Oxime

Alkylhalogenide	Amine/Aniline	Alkylamine
Alkylhalogenide	Carbonsäuren	Ester
Alkylhalogenide	Thiole	Thioether
Alkylhalogenide	Alkohole/Phenole	Ether
Alkylsulfonate	Thiole	Thioether
Alkylsulfonate	Carbonsäuren	Ester
Alkylsulfonate	Alkohole/Phenole	Ester
Anhydride	Alkohole/Phenole	Ester
Anhydride	Amine/Aniline	Carboxamide
Arylhalogenide	Thiole	Thiophenole
Arylhalogenide	Amine	Arylamine
Aziridine	Thiole	Thioether
Boronate	Glykole	Boronsäureester
Carbodiimide	Carbonsäuren	N-Acyloharnstoffe oder Anhydride
Diazoalkane	Carbonsäuren	Ester
Epoxide	Thiole	Thioether
Halogenacetamide	Thiole	Thioether
Halogenplatinat	Amino	Platinkomplex
Halogenplatinat	Heterozyklus	Platinkomplex
Halogenplatinat	Thiol	Platinkomplex
Halogentriazine	Amine/Aniline	Aminotriazine
Halogentriazine	Alkohole/Phenole	Triazinylether
Imidoester	Amine/Aniline	Amidine
Isocyanate	Amine/Aniline	Harnstoffe
Isocyanate	Alkohole/Phenole	Urethane
Isothiocyanate	Amine/Aniline	Thioharnstoffe
Maleimide	Thiole	Thioether
Phosphoramidite	Alkohole	Phosphitester
Silylhalogenide	Alkohole	Silylether
Sulfonsäureester	Amine/Aniline	Alkylamine
Sulfonsäureester	Thiole	Thioether
Sulfonsäureester	Carbonsäuren	Ester

Sulfonsäureester	Alkohole	Ether
Sulfonylhalogenide	Amine/Aniline	Sulfonamide
Sulfonylhalogenide	Phenole/Alkohole	Sulfonsäureester

* Aktivierte Ester, wie sie im Fachgebiet verstanden werden, weisen im allgemeinen die Formel $-CO\Omega$ auf, worin Ω für eine gute Abgangsgruppe steht (z.B. Succinimidyl- ($-OC_4H_4O_2$), Sulfosuccinimidyl- ($OC_4H_3O_2-SO_3H$), -1-Oxybenzotriazolyl- ($-OC_6H_4N_3$) oder eine Aryloxygruppe oder ein ein- oder mehrfach mit elektronenziehenden Substituenten, wie beispielsweise Nitro, Fluor, Chlor, Cyano oder Trifluormethyl oder Kombinationen daraus substituiertes Aryloxy, verwendet zur Bildung aktivierter Arylester; oder eine durch ein Carbodiimid unter Bildung eines Anhydrids oder gemischten Anhydrids $OCOR^a$ oder $-OCNR^aNHR^b$ aktivierte Carbonsäure, worin R^a und R^b , die gleich oder verschieden sein können, für C_1-C_6 -Alkyl, C_1-C_6 -Perfluoralkyl oder C_1-C_6 -Alkoxy stehen; oder Cyclohexyl, 3-Dimethylaminopropyl oder N-Morpholinoethyl).

** Acylazide können sich auch zu Isocyanaten umlagern.

[0036] Die kovalente Verknüpfung L bindet die reaktive Gruppe R_x oder die konjugierte Substanz S_c an die Verbindung, und zwar entweder direkt (L ist eine Einfachbindung) oder mit einer Kombination aus stabilen chemischen Bindungen, gegebenenfalls einschließlich Einfach-, Doppel-, Dreifach- oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, ebenso wie Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen, Stickstoff-Stickstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen, Kohlenstoff-Schwefel-Bindungen, Phosphor-Sauerstoff-Bindungen, Phosphor-Stickstoff-Bindungen und Stickstoff-Platin-Bindungen. L enthält typischerweise Ether-, Thioether-, Carboxamid-, Sulfonamid-, Harnstoff-, Urethan- oder Hydrazingruppierungen. In einer Ausführungsform ist in der kovalenten Verknüpfung ein Platinatom eingebaut, wie beispielsweise in US-Patent Nr. 5,714,327 beschrieben. Bevorzugte Gruppierungen L weisen 1–20 Nicht-Wasserstoff-Atome, ausgewählt aus der Gruppe C, N, O, P und S auf und setzen sich aus einer beliebigen Kombination von Ether-, Thioether-, Amin-, Ester-, Carboxamid-, Sulfonamid-, Hydrazidbindungen sowie aromatischen oder heteroaromatischen Bindungen zusammen. Vorzugsweise steht L für eine Kombination aus Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindungen und Carboxamid- oder Thioetherbindungen. Der längste lineare Abschnitt der Verknüpfung L enthält vorzugsweise 4–10 Nicht-Wasserstoff-Atome, einschließlich ein oder zwei Heteroatome. Zu L gehören beispielsweise substituiertes oder unsubstituiertes Polymethylen, Arylen, Alkylarylen, Arylenalkyl oder Arylthio. In einer Ausführungsform enthält L 1–6 Kohlenstoffatome; in einer weiteren Ausführungsform umfaßt L eine Thioetherverknüpfung. In noch einer weiteren Ausführungsform steht L für bzw. beinhaltet die Formel $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_e)_z-$ oder $(CH_2)_d(CON(CH_2)_4NH(CH_2)_e)_z-$, $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_eNH_2)_z-$, $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_eNHCO)_z-$, worin d gleich 0–5, e gleich 1–5 und z' gleich 0 oder 1 ist.

[0037] Die Wahl der zur Anbindung des Farbstoffs an die zu konjugierende Substanz verwendeten reaktiven Gruppe hängt typischerweise von der funktionellen Gruppe an der zu konjugierenden Substanz sowie der Länge der gewünschten kovalenten Verknüpfung ab. Zu den Arten von funktionellen Gruppen, die typischerweise an den organischen oder anorganischen Substanzen vorliegen, gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, Amine, Amide, Thiole, Alkohole, Phenole, Aldehyde, Ketone, Phosphate, Imidazole, Hydrazine, Hydroxylamine, disubstituierte Amine, Halogenide, Epoxide, Carbonsäureester, Sulfonsäureester, Purine, Pyrimidine, Carbonsäure, olefinische Bindungen oder eine Kombination aus diesen Gruppen. Auf der Substanz kann eine einzige Art von reaktiver Stelle verfügbar sein (typisch für Polysaccharide) oder es können verschiedene Stellen auftreten (Amine, Thiole, Alkohole, Phenole), wie es für Proteine typisch ist. Eine konjugierte Substanz kann an mehr als einen Farbstoff, der gleich oder verschieden sein kann, oder an eine Substanz, die zusätzlich mit einem Hapten, wie z.B. Biotin, modifiziert ist, konjugiert sein. Obwohl sich eine gewisse Selektivität durch sorgfältige Steuerung der Reaktionsbedingungen erreichen läßt, erhält man die Markierungsselektivität am besten über die Auswahl eines entsprechenden reaktiven Farbstoffs.

[0038] Typischerweise reagiert R_x mit einem Amin, einem Thio, einem Alkohol, einem Aldehyd oder einem Keton. Vorzugsweise reagiert R_x mit einer funktionellen Amin- oder Thiolgruppe. In einer Ausführungsform steht R_x für ein Acrylamid, ein reaktives Amin (einschließlich einem Cadaverin oder Ethylendiamin), einen aktivierten Ester einer Carbonsäure (typischerweise einen Succinimidylester einer Carbonsäure), ein Acylazid, ein Acylnitril, einen Aldehyd, ein Alkylhalogenid, ein Anhydrid, ein Anilin, ein Arylhalogenid, ein Azid, ein Aziridin, ein Boronat, eine Carbonsäure, ein Diazoalkan, ein Halogenacetamid, ein Halogentriazin, ein Hydrazin (einschließlich Hydrazide), einen Imidoester, ein Isocyanat, ein Isothiocyanat, ein Maleimid, ein Phosphoramidit, einen reaktiven Platinkomplex, ein Sulfonylhalogenid oder eine Thiolgruppe. Unter "reaktiver Platinkomplex" versteht man insbesondere chemisch reaktive Platinkomplexe, wie etwa die in den US-Patenten Nr. 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566 beschriebenen.

[0039] Handelt es sich bei der reaktiven Gruppe um eine photoaktivierbare Gruppe, wie z.B. ein Azid, Diaziriny, Azidoaryl oder ein Psoralenderivat, so wird der Farbstoff nur nach Bestrahlung mit Licht einer entsprechenden Wellenlänge chemisch reaktiv.

[0040] Steht R_x für einen aktivierten Ester einer Carbonsäure, so eignet sich der reaktive Farbstoff insbesondere zur Herstellung von Farbstoffkonjugaten von Proteinen, Nukleotiden, Oligonukleotiden oder Haptenen. Steht R_x für eine Maleimid oder Halogenacetamid, so eignet sich der reaktive Farbstoff insbesondere zur Konjugation an thiolhaltige Substanzen. Steht R_x für ein Hydrazid, so eignet sich der reaktive Farbstoff insbesondere zur Konjugation an periodatoxydierte Kohlenhydrate und Glykoproteine und stellt darüber hinaus einen durch Aldehyd fixierbaren polaren Tracer für die Zellmikroinjektion dar.

[0041] Vorzugsweise steht R_x für eine Carbonsäure, einen Succinimidylester einer Carbonsäure, ein Halogenacetamid, ein Hydrazin, ein Isothiocyanat, eine Maleimidgruppe, ein aliphatisches Amin, eine Perfluorbenzamid-, eine Azidoperfluorbenzamidogruppe oder ein Psoralen. Stärker bevorzugt steht R_x für einen Succinimidylester einer Carbonsäure, ein Maleimid, ein Iodacetamid oder einen reaktiven Platinkomplex. In einer besonderen Ausführungsform steht R_x für einen reaktiven Platinkomplex oder einen Succinimidylester einer Carbonsäure. Steht R_x für einen reaktiven Platinkomplex, so handelt es sich typischerweise um ein Halogenplatinat oder ein Platinnitrat.

[0042] Auf der Grundlage der oben erwähnten Eigenschaften wird der entsprechende erfindungsgemäße reaktive Farbstoff zur Herstellung des gewünschten Farbstoffkonjugats ausgewählt, dessen vorteilhafte Eigenschaften sich für eine große Vielfalt von Anwendungen eignen. Im Vergleich mit Konjugaten allgemein verwendeter Carbocyaninfarbstoffe, bei denen die Anbindung an der 1-Stellung der Indoliumgruppierung erfolgt (z.B. Amersham's Cy dyes™), weisen die Farbstoffkonjugate der vorliegenden Erfindung nachweislich bessere optische Eigenschaften auf. Siehe beispielsweise Beispiel 49, in dem Proteinkonjugate des Farbstoffs Cy3 und spektralähnliche Konjugate der erfindungsgemäßen Verbindung 13 verglichen werden (mit $n = 1$); Tabellen 2 und 4 mit einem ausführlichen Vergleich von Proteinkonjugaten des Farbstoffs Cy5 mit den spektralähnlichen Konjugaten der erfindungsgemäßen Verbindung 9 (mit $n = 2$); Beispiele 45–46, 48 und 50 sowie [Fig. 2–Fig. 3](#). Siehe ebenso Beispiel 52 mit einem Vergleich von Farbstoff-Fluorophorkonjugaten; ebenso wie Tabelle 5, Beispiele 58–60 mit einem Vergleich von Farbstoff-Nukleinsäure-Konjugaten sowie Beispiele 48 und 52, sowie für einen durchflußcytometrischen Vergleich von mit Farbstoffkonjugaten markierten Zellpopulationen. Das gewünschte Farbstoffkonjugat wird bezogen auf die vorgesehene Anwendung ausgewählt.

[0043] Zu besonders geeigneten Farbstoffkonjugaten gehören unter anderen Konjugate, bei denen S_c für ein Antigen, Steroid, Vitamin, einen Arzneistoff, ein Hapten, einen Metaboliten, ein Toxin, einen Umweltschadstoff, eine Aminosäure, ein Peptid, ein Protein, eine Nukleinsäure, ein Nukleinsäurepolymer, Kohlenhydrat, Lipid, eine ionenkomplexierende Gruppierung oder für Glas, Kunststoff oder ein anderes nichtbiologisches Polymer steht. Als Alternative steht S_c für eine Zelle, ein Zellsystem, ein Zellfragment oder ein subzelluläres Partikel, z.B. unter anderem ein Viruspartikel, Bakterienpartikel, einen Virusbestandteil, eine biologische Zelle (wie z.B. eine Tierzelle, Pflanzenzelle, Bakterien, Hefe oder ein Protist) oder einen Zellbestandteil. Reaktive Farbstoffe markieren typischerweise funktionelle Gruppen an der Zelloberfläche, in Zellmembranen, Organellen oder im Zytoplasma.

[0044] Typischerweise steht S_c für eine Aminosäure, ein Peptid, Protein, Tyramin, Polysaccharid, eine ionenkomplexierende Gruppierung, ein Nukleosid, Nukleotid, Oligonukleotid, eine Nukleinsäure, ein Hapten, Psoralen, einen Arzneistoff, ein Hormon, Lipid, einen Lipidverbund, ein Polymer, ein polymeres Mikropartikel, eine biologische Zelle oder ein Virus. Noch typischer steht S_c für ein Peptid, ein Protein, ein Nukleotid, ein Oligonukleotid oder eine Nukleinsäure. Konjugiert man erfindungsgemäße Farbstoffe an derartige Biopolymere, so können dabei mehrere Farbstoffe pro Molekül eingebaut werden, um das Fluoreszenzsignal zu verstärken. So können beispielsweise mindestens vier Moleküle derartiger Farbstoffe pro Antikörpermolekül ohne Verlust an Gesamtfluoreszenz eingebaut werden, während die Fluoreszenz des spektralvergleichbaren Cy5 (mit $n = 2$) stark gequenchet wird, wenn mehr als ungefähr zwei Cy5-Farbstoffe pro Antikörper eingebaut werden. Diese Ergebnisse bestätigen Probleme mit Cy-Farbstoffkonjugaten, die von anderen berichtet wurden, z.B. BIOCONJUGATE CHEM. 11, 696 (2000). Im Vergleich mit im Handel erhältlichen Cy5-Konjugaten oder Konjugaten bekannter Farbstoffe fluoreszieren die optimal markierten erfindungsgemäßen Konjugate typischerweise wenigstens zweimal, üblicherweise mehr als dreimal und manchmal mehr als viermal stärker als Konjugate des Cy5-Farbstoffs bei der gleichen Antikörperkonzentration (Tabelle 3).

Tabelle 3

Protein	Quelle	Verbindung	DOS‡	RQY†	TF§
GAR IgG	Molecular Probes	9	2,10	1,6	3,3
GAR IgG	Molecular Probes	9	3,0	1,4	4,3
GAR IgG	Molecular Probes	9	4,1	1,1	4,5
GAR IgG	Molecular Probes	9	5,2	0,9	4,7
GAR IgG	Molecular Probes	9	7,6	0,6	4,6
GAR IgG	Molecular Probes	9	8,2	0,5	4,1
GAR IgG	Molecular Probes	Cy5	2,4	0,95	2,3
GAR IgG	Molecular Probes	Cy5	4,1	0,5	2,1

GAR IgG	Molecular Probes	Cy5	4,5	0,2	0,9
GAR IgG	Molecular Probes	Cy5	5	0,3	1,5
GAR IgG	Molecular Probes	Cy5	5,8	0,03	0,2
GAR IgG	Jackson Labs	Cy5	2,2	1,1	2,4
GAR IgG	Chemicon	Cy5	3,3	0,82	2,7
GAR IgG	Zymed	Cy5	4,7	0,53	2,5
GAR IgG	Amersham-Pharmacia Biotech	Cy5	5,7	0,22	1,3
GAR IgG	Kirkegaard & Perry	Cy5	5,7	0,20	1,1
GAR IgG	Rockland	Cy5	10,1	0,05	0,5
GAR IgG	Molecular Probes	30	2,7	0,7	1,9
GAR IgG	Molecular Probes	30	4,3	0,28	1,2
GAR IgG	Molecular Probes	30	5,4	0,10	0,5
GAR IgG	Molecular Probes	24	2,9	0,8	2,2
GAR IgG	Molecular Probes	24	4,3	0,33	1,4
GAR IgG	Molecular Probes	24	5,6	0,15	0,8
GAR IgG	Molecular Probes	25	2,0	0,7	1,4
GAR IgG	Molecular Probes	25	2,9	0,35	1,0
GAR IgG	Molecular Probes	25	3,9	0,13	0,5
GAR IgG	Molecular Probes	27	2,0	0,9	1,8
GAR IgG	Molecular Probes	27	3,2	0,52	1,6
GAR IgG	Molecular Probes	27	4,2	0,28	1,2
GAR IgG	Molecular Probes	26	1,4	0,58	0,81
GAR IgG	Molecular Probes	26	2,1	0,3	0,61
GAR IgG	Molecular Probes	26	2,9	0,1	0,29
GAM IgG	Molecular Probes	9	2,1	1,4	2,9
GAM IgG	Molecular Probes	9	2,2	1,4	3,1
GAM IgG	Molecular Probes	9	3,1	1,1	3,5
GAM IgG	Molecular Probes	9	4,2	1,2	5,0
GAM IgG	Molecular Probes	9	5,2	0,6	3,2
GAM IgG	Jackson Labs	Cy5	1,9	1,0	1,9
GAM IgG	Molecular Probes	Cy5	2	0,9	1,8
GAM IgG	Molecular Probes	Cy5	3,3	0,5	1,6

GAM IgG	Molecular Probes	Cy5	4,8	0,09	0,4
Concanavalin A	Molecular Probes	9	1,7	1,2	2,0
Concanavalin A	Molecular Probes	9	2,2	0,8	1,8
Concanavalin A	Molecular Probes	9	3,3	0,9	2,9
Concanavalin A	Molecular Probes	9	3,7	0,6	2,3
Concanavalin A	Molecular Probes	9	5,5	0,6	3,3
Concanavalin A	Molecular Probes	9	5,6	0,8	4,5
Concanavalin A	Molecular Probes	Cy5	1,3	0,9	1,2
Concanavalin A	Molecular Probes	Cy5	2,4	0,5	1,2
Concanavalin A	Molecular Probes	Cy5	3,1	0,2	0,6
Concanavalin A	Molecular Probes	Cy5	3,3	0,8	2,6
Concanavalin A	Molecular Probes	Cy5	4,4	0,3	1,3
Concanavalin A	Molecular Probes	Cy5	6,5	0,1	0,7
Streptavidin	Molecular Probes	9	2,2	2,4	5,4
Streptavidin	Molecular Probes	9	2,8	1,9	5,3
Streptavidin	Molecular Probes	9	3,4	1,9	6,5
Streptavidin	Molecular Probes	9	4,1	1,8	7,3
Streptavidin	Molecular Probes	9	4,5	1,7	7,6
Streptavidin	Molecular Probes	9	5,2	1,6	8,3
Streptavidin	Molecular Probes	Cy5	1,6	1,8	2,8
Streptavidin	Molecular Probes	Cy5	2,7	1,5	4,1
Streptavidin	Jackson Labs	Cy5	3,3	1,8	6,0
Streptavidin	Amersham-Pharmacia Biotech	Cy5	3,6	1,4	5,0
Streptavidin	Molecular Probes	Cy5	3,6	1,4	5,0
Transferrin	Molecular Probes	9	1,8	1,5	2,7
Transferrin	Molecular Probes	9	2,7	1,3	3,5
Transferrin	Molecular Probes	9	3,7	1,2	4,4
Transferrin	Molecular Probes	9	4,2	1,1	4,4
Transferrin	Molecular Probes	9	5,8	0,7	4,1
Transferrin	Molecular Probes	9	5,9	0,6	3,5

Transferrin	Molecular Probes	Cy5	0,8	1,1	0,9
Transferrin	Molecular Probes	Cy5	1,4	0,8	1,1
Transferrin	Molecular Probes	Cy5	2,7	0,5	1,4
Transferrin	Molecular Probes	Cy5	3,0	0,7	2,1
Transferrin	Molecular Probes	Cy5	5,3	0,1	0,5
Transferrin	Molecular Probes	Cy5	5,8	0,02	0,1

† RQY (Relative Quantum Yield [= relative Quantenausbeute]) wird gemessen, indem man die Absorption zwi-

schen dem Biokonjugat und DDAO (7-Hydroxy-9H-(1,3-dichlor-9,9-dimethylacridin-2-on)) gegeneinander abgleicht und die integrierten Fluoreszenzemissionsintensitäten vergleicht.

‡ DOS (Degree of Substitution [= Substitutionsgrad]) steht für das ungefähre Molverhältnis des Farbstoffs zum Protein nach Konjugation. DOS-Abschätzung unter Verwendung molarer Extinktionskoeffizienten von 250, 000 cm^{-1} für Cy5 bzw. 239, 000 cm^{-1} für Biokonjugate von Cy5 bzw. Verbindung 9 sowie Proteinextinktionskoeffizienten aus der Literatur und einem Sichtbarer-Farbstoff-Korrekturausdruck (bei 280 nm) von 3–5%.

§ TF (Total Fluorescence [= Gesamtfluoreszenz]) ist proportional zur Gesamthelligkeit des Biokonjugats und definiert als Produkt aus RQY und DOS: $TF = RQY \times DOS$.

[0045] Alternativ steht S_c für einen Liganden oder ein Hapten, wie etwa Biotin. Ein bevorzugtes Konjugat ist ein Phenol, wie beispielsweise ein Tyramin (z.B. wie beschrieben in den US-Patenten 5,196,306; 5,583,001; 5,731,158; wobei sich das Konjugat als Substrat für Meerrettich-Peroxidase eignet).

[0046] In einer Ausführungsform steht S_c für ein biologisches Polymer, wie beispielsweise ein Peptid, Protein, Oligonukleotid oder Nukleinsäurepolymer, das auch mit wenigstens einem zweiten Nicht-Fluoreszenz- oder Fluoreszenzfarbstoff (gegebenenfalls einem zusätzlichen Farbstoff der vorliegenden Erfindung) markiert ist, sodaß ein Energieübertragungspaar gebildet wird. In einigen erfindungsgemäßen Aspekten fungiert das markierte Konjugat als ein Enzymsubstrat, wobei die enzymatische Hydrolyse die Energieübertragung unterbricht. Als Alternative ist S_c selbst ein Fluoreszenz- oder Nicht-Fluoreszenzfarbstoff, gegebenenfalls ein zusätzlicher Farbstoff der vorliegenden Erfindung, wobei das Farbstoffkonjugat einen Markierungskomplex bildet, der aufgrund interner Energieübertragung eine große Stokes'sche Verschiebung zeigt (wie in US-Patent 6,008,373 oben beschrieben) und sich zur Markierung einer organischen oder anorganischen Substanz eignet (Beispiel 52).

[0047] In einer Ausführungsform steht S_c für eine Aminosäure (einschließlich solcher, die durch Phosphate, Kohlenhydrate oder C_{1-} bis C_{22-} Carbonsäuren geschützt oder damit substituiert sind) oder für ein Polymer aus Aminosäuren, wie beispielsweise ein Peptid oder Protein. Bevorzugte Peptidkonjugate enthalten wenigstens fünf Aminosäuren, stärker bevorzugt 5 bis 36 Aminosäuren. Zu bevorzugten Peptiden gehören, ohne darauf beschränkt zu sein, Neuropeptide, Cytokine, Toxine, Proteasesubstrate sowie Proteinkinasesubstrate. Zu bevorzugten Proteinkonjugaten gehören Enzyme, Antikörper, Lectine, Glykoproteine, Histone, Albumine, Lipoproteine, Avidin, Streptavidin, Protein A, Protein G, Phycobiliproteine und andere Fluoreszenzproteine, Hormone, Toxine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. In einem bevorzugten Aspekt handelt es sich bei dem konjugierten Protein um ein Phycobiliprotein, wie beispielsweise Allophycocyanin, Phycocyanin, Phycoerythrin, Allophycocyanin B, B-Phycoerythrin, Phycoerythrocyanin und b-Phycoerythrin (siehe zum Beispiel US-Patent 5,714,386 an Roederer (1998)). Besonders bevorzugt sind Konjugate von R-Phycoerythrin und von Allophycocyanin mit ausgewählten erfindungsgemäßen Farbstoffen, die als Energieakzeptoren oder -donatoren im angeregten Zustand dienen. Bei diesen Konjugaten führt eine Energieübertragung im angeregten Zustand zu einer langwelligen Fluoreszenzemission, wenn bei relativ kurzen Wellenlängen angeregt wird (Beispiel 52). In einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt handelt es sich bei dem konjugierten Protein um einen Antikörper, ein Antikörperfragment, Avidin, Streptavidin, ein Toxin, ein Lectin, ein Hormon, ein Chemokin oder einen Wachstumsfaktor. Ist die konjugierte Substanz ein Toxin, so handelt es sich dabei typischerweise um ein Neuropeptid oder ein Phallotoxin, wie z.B. Phalloidin.

[0048] In einer weiteren Ausführungsform steht S_c für eine Nukleinsäurebase, ein Nukleosid, Nukleotid (Beispiel 55) oder ein Nukleinsäurepolymer (Beispiele 56–59), einschließlich solcher, die so modifiziert sind, daß sie einen zusätzlichen Linker oder Spacer zur Anbindung der erfindungsgemäßen Farbstoffe, wie z.B. eine Alkenylverknüpfung (US-Patent 5,047,519), eine Aminoallylverknüpfung (US-Patent 4,711,955) oder einen heteroatom-substituierten Linker (US-Patent 5,684,142) oder eine andere Verknüpfung, besitzen. In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der konjugierten Substanz um ein Nukleosid- oder Nukleotidanalogue, bei dem eine Purin- oder Pyrimidinbase mit einer Phosphat- oder Polyphosphatgruppierung über einen nicht-zyklischen Spacer verknüpft ist. In einer dritten Ausführungsform ist der Farbstoff an den Kohlenhydratanteil eines Nukleotids oder Nukleosids konjugiert, und zwar typischerweise über eine Hydroxylgruppe, jedoch zusätzlich über eine Thiol- oder Aminogruppe (US-Patent 5,659,025, US-Patent 5,668,268, US-Patent 5,679,785). Typischerweise handelt es sich bei dem konjugierten Nukleotid um ein Nukleosidtriphosphat oder ein Desoxynukleosidtriphosphat oder ein Didesoxynukleosidtriphosphat. Der Einbau von Methylengruppierungen oder Stickstoff- oder Schwefel-Heteroatomen in die Phosphat- oder Polyphosphatgruppierungen ist auch sinnvoll. Nicht-Purin- und Nicht-Pyrimidinbasen, wie z.B. 7-Deazapurine (US-Patent 6,150,510) sowie Nukleinsäuren, die solche Basen enthalten, lassen sich auch an erfindungsgemäße Farbstoffe koppeln. Mit durch Umsetzung depuriniertes Nukleinsäuren mit Amin-, Hydrazid- oder Hydroxylaminderivaten hergestellten Nuk-

leinsäureprodukten wird ein zusätzliches Mittel zur Markierung und zum Nachweis von Nukleinsäuren bereitgestellt, z.B. "A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair." Atamna H, Cheung I, Ames BN. Proc Natl Acad Sci USA 97, 686–691 (2000).

[0049] Bevorzugte Nukleinsäurepolymerkonjugate sind markierte, einzel- oder mehrsträngige, natürliche oder synthetische DNA oder RNA, DNA- oder RNA-Oligonukleotide oder DNA/RNA-Hybride oder beinhalten einen ungewöhnlichen Linker, wie beispielsweise mit Morpholin derivatisierte Phosphate (AntiVirals, Inc., Corvallis OR), oder Peptidnukleinsäuren, wie z.B. N-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten. Handelt es sich bei der Nukleinsäure um ein synthetisches Oligonukleotid, so enthält dieses typischerweise weniger als 50 Nukleotide, noch typischer weniger als 25 Nukleotide. Für einige Anwendungen können Konjugate von Peptidnukleinsäuren (PNA) (Nielsen et al US-Patent 5,539,082 bevorzugt sein, da sie im allgemeinen schnellere Hybridisierungsgeschwindigkeiten aufweisen).

[0050] Fluoreszenznukleinsäurepolymere werden typischerweise aus markierten Nukleotiden oder Oligonukleotiden unter Verwendung einer mit Oligonukleotidprimern durchgeführten DNA-Polymerisierung (Beispiel 59) hergestellt, wie beispielsweise unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion oder über Primerverlängerung oder durch die von terminaler Transferase katalysierte Addition eines markierten Nukleotids an ein 3'-Ende eines Nukleinsäurepolymers. Fluoreszierende RNA-Polymere werden typischerweise aus markierten Nukleotiden durch Transkription hergestellt. Dabei wird der Farbstoff typischerweise über eine oder mehrere Purin- oder Pyrimidinbasen durch eine Amid-, Ester-, Ether- oder Thioetherbindung gebunden; oder wird an das Phosphat oder Kohlenhydrat über eine Bindung, bei der es sich um einen Ester, Thioester, ein Amid, einen Ether oder Thioether handelt, gebunden. Als Alternative wird das erfindungsgemäße Farbstoffkonjugat gleichzeitig mit einem 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, markiert. Erfindungsgemäße Nukleotidkonjugate werden leicht von DNA-Polymerase eingebaut und lassen sich zur In-situ-Hybridisierung sowie zur Nukleinsäuresequenzierung verwenden (z.B. US-Patente 5,332,666; 5,171,534; und 4,997,928 sowie WO-Anmeldung 94/05688). In einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt ist in dem Oligonukleotid ein aliphatisches Amin, das anschließend an einen erfindungsgemäßen aminreaktiven Farbstoff konjugiert wird, oder ein Thiol oder Thio-phosphat, das an einen erfindungsgemäßen thiolreaktiven Farbstoff konjugiert wird, eingebaut. In noch einem weiteren erfindungsgemäßen Aspekt reagieren die Purinbasen des Oligonukleotids mit einem reaktiven Metallkomplex (vorzugsweise einen Platinkomplex), der an einen erfindungsgemäßen Farbstoff gebunden ist, wobei ein Farbstoffkonjugat erhalten wird (Beispiel 58). Nukleinsäurekonjugate von erfindungsgemäßen Farbstoffen, die in 3-Stellung des Indoliumrings verknüpft sind, weisen unerwarteterweise Spektraleigenschaften auf, die besser sind als die strukturell ähnlicher Carbocyaninfarbstoffe, wobei der Farbstoff nicht in 3-Stellung des Indoliumrings verknüpft ist (Beispiele 58–60, Tabelle 8).

[0051] In einer Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen konjugierten Oligonukleotiden um Aptamere für ein bestimmtes Zielmolekül, wie beispielsweise einen Metaboliten, Farbstoff, ein Hapten oder ein Protein. Das heißt, die Oligonukleotide wurde so ausgewählt, daß sie vorzugsweise an das Zielmolekül binden. Verfahren zur Herstellung und zum Screening von Aptameren für ein gegebenes Zielmolekül sind bereits beschrieben und im Fachgebiet bekannt (z.B. US-Patent 5,567,588 an Gold (1996)).

[0052] In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der konjugierten Substanz (S_c) um ein Kohlenhydrat, bei dem es sich typischerweise um ein Polysaccharid, wie z.B. ein Dextran, FICOLL™, Heparin, Glykogen, Amylopectin, Mannan, Inulin, Stärke, Agarose und Cellulose, handelt. Alternativ ist das Kohlenhydrat ein Polysaccharid, bei dem es sich um ein Lipopolysaccharid handelt. Bevorzugte Polysaccharidkonjugate sind Dextran-, FICOLL™- oder Lipopolysaccharid-Konjugate.

[0053] In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der konjugierten Substanz (S_c) um ein Lipid (typischerweise mit 6–60 Kohlenstoffatomen), einschließlich Glykolipiden, Phospholipiden, Sphingolipiden und Steroiden. Alternativ handelt es sich bei der konjugierten Substanz um einen Lipidverbund, wie z.B. ein Liposom. Die lipophile Gruppierung kann dazu verwendet werden, um die konjugierten Substanzen in Zellen zurückzubehalten, wie beispielsweise im US-Patent 5,208,148 beschrieben. Bestimmte polare erfindungsgemäße Farbstoffe können auch in den Lipidverbundanordnungen eingeschlossen sein.

[0054] Konjugate mit einer ionenkomplexierenden Gruppierung dienen als Indikatoren für Calcium, Natrium, Magnesium, Zink, Kalium oder andere biologisch wichtige Metallionen. Bevorzugte ionenkomplexierende Gruppierungen sind Kronenether (US-Patent 5,405,975 sowie US-Patent 6,962,992, Derivate von 1,2-Bis-(2-aminophenoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA Chelatoren; US-Patent 5,453,517, US-Patent 5,516,911 und US-Patent 5,049,673); Derivate von 2-Carboxymethoxyanilin-N,Ndiessigsäure (APT-

RA-Chelatoren; AM. J. PHYSIOL. 256, C540 (1989)) oder Metallionenchelatoren auf Pyridin- und Phenanthrolinbasis (US-Patent 5,648,270) oder Derivate der Nitrilotriessigsäure, siehe z.B. "Single-step synthesis and characterization of biotinylated nitrilotriacetic acid, a unique reagent for the detection of histidine-tagged proteins immobilized on nitrocellulose"; McMahan SA, Burgess RR. Anal Biochem 236, 101–106 (1996). Vorzugsweise handelt es sich bei der Ionenkomplexierenden Gruppierung um einen Kronenetherchelator, einen BAPTA-Chelator, einen APTRA-Chelator oder ein Derivat der Nitrilotriessigsäure.

[0055] Zu weiteren Konjugaten nichtbiologischer Materialien gehören Farbstoffkonjugate organischer oder anorganischer Polymere, Polymerfilme, Polymer-Wafer, Polymer-Membranen, Polymer-Partikel oder polymere Mikropartikel (Beispiel 53), einschließlich magnetischen und nichtmagnetischen Mikrokügelchen, Eisen-, Gold- oder Silberpartikeln, leitenden und nichtleitenden Metallen und Nichtmetallen sowie Glas- und Kunststoffoberflächen und -Partikel. Konjugate werden gegebenenfalls durch Copolymerisierung eines Farbstoffs, der eine entsprechenden Funktionalität enthält, während der Herstellung des Polymers oder durch chemische Modifikation eines Polymers, der funktionelle Gruppen mit geeigneter chemischer Reaktivität enthält, hergestellt. Weitere Reaktionsarten, die sich zur Herstellung von Farbstoffkonjugaten von Polymeren eignen, umfassen katalysierte Polymerisationen oder Copolymerisationen von Alkenen sowie Umsetzungen von Dienen mit Dienophilen, Transesterifizierungen oder Transaminierungen. In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei der konjugierten Substanz um ein Glas oder um Siliciumdioxid, das zu einer optischen Faser oder einer anderen Struktur geformt werden kann.

[0056] In einem erfindungsgemäßen Aspekt steht S_c für eine konjugierte Substanz, bei der es sich um einen Antikörper (einschließlich intakter Antikörper, Antikörperfragmente und Antikörperseren usw.), eine Aminosäure, ein Angiostatin oder Endostatin, ein Avidin oder Streptavidin, ein Biotin (z.B. ein Amidobiotin, ein Biocytin, ein Desthiobiotin usw.), eine Blutprotein-Komponente (z.B. ein Albumin, ein Fibrinogen, ein Plasminogen, usw.), ein Dextran, ein Enzym, einen Enzyminhibitor, ein IgG-bindendes Protein (z.B. ein Protein A, Protein G, Protein A/G, usw.), ein Fluoreszenzprotein, (z.B. ein Phycobiliprotein, ein Aequorin, ein grünes Fluoreszenzprotein usw.), einen Wachstumsfaktor, ein Hormon, ein Lectin (z.B. ein Weizenkeimagglutinin, ein Concanavalin A usw.), ein Lipopolysaccharid, ein metallbindendes Protein (z.B. ein Calmodulin, usw.), einen Mikroorganismus oder einen Teil davon (z.B. ein Bakterium, ein Virus, eine Hefe usw.), ein Neuropeptid und andere biologisch aktive Faktoren (z.B. ein Dermorphin, ein Deltropin, ein Endomorphin, ein Endorphin, ein Tumornekrosefaktor usw.), ein nichtbiologisches Mikropartikel (z.B. aus Ferrofluid, Gold, Polystyrol, usw.), ein Nukleotid, ein Oligonukleotid, ein Peptidtoxin (z.B. ein Apamin, ein Bungarotoxin, ein Phalloidin, usw.), ein phospholipidbindendes Protein (z.B. ein Annexin, usw.), einen kleinmolekularen Arzneistoff (z.B. ein Methotrexat usw.), ein Strukturprotein (z.B. ein Actin, ein Fibronectin, ein Laminin, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, ein Tubulin usw.), oder ein Tyramid handelt.

[0057] In einer Ausführungsform sind Konjugate biologischer Polymere, wie z.B. Peptide, Proteine, Oligonukleotide, Nukleinsäurepolymere, auch mit wenigstens einem zweiten Fluoreszenz- oder Nicht-Fluoreszenzfarbstoff, bei dem es sich gegebenenfalls um einen zusätzlichen Farbstoff der vorliegenden Erfindung handelt, markiert, sodaß ein Energieübertragungspaar gebildet wird. In einigen erfindungsgemäßen Aspekten fungiert das markierte Konjugat als ein Enzymsubstrat, wobei die enzymatische Hydrolyse die Energieübertragung unterbricht. Als Alternative ist die konjugierte Substanz selbst ein Fluoreszenz- oder Nicht-Fluoreszenzfarbstoff, gegebenenfalls ein zusätzlicher Farbstoff der vorliegenden Erfindung, der einen Markierungskomplex bildet, der aufgrund interner Energieübertragung eine große Stokes'sche Verschiebung zeigt (wie im US-Patent 6,008,373 an Waggoner et al., (1999) beschrieben). In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Energieübertragungspaar, das einen erfindungsgemäßen Farbstoff beinhaltet, an ein Oligonukleotid konjugiert, das in seiner Haarnadelkonformation wirksames Fluoreszenzquenchen zeigt (die sogenannten "molecular beacons" von Tyagi et al., NATURE BIOTECHNOLOGY 16, 49 (1998)) oder Fluoreszenzenergieübertragung zeigt.

[0058] Die Herstellung von Farbstoffkonjugaten unter Verwendung reaktiver Farbstoffe ist gut dokumentiert, beispielsweise von R. Haugland, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Kapitel 1–3 (1996); und Brinkley, BIOCONJUGATE CHEM., 3, 2 (1992). Konjugate werden typischerweise erhalten, indem man entsprechende reaktive Farbstoffe und die zu konjugierende Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel, in dem beide löslich sind, mischt. Die Mehrzahl der erfindungsgemäßen Farbstoffe ist leicht in wäßrigen Lösungen löslich, was die Konjugationsreaktionen mit den meisten biologischen Materialien erleichtert. Bei denjenigen reaktiven Farbstoffen, die photoaktiviert werden, ist für die Konjugation eine Bestrahlung des Reaktionsgemischs zur Aktivierung des reaktiven Farbstoffs erforderlich.

[0059] Markierte Mitglieder eines spezifischen Bindungspaares werden typischerweise als Fluoreszenzsonden

für das komplementäre Mitglied dieses spezifischen Bindungspaares verwendet, wobei jedes Mitglied eines spezifischen Bindungspaares eine Zone auf der Oberfläche oder in einer Höhlung aufweist, die spezifisch an eine bestimmte räumliche und polare Anordnung des jeweils anderen Mitglieds bindet und dazu komplementär ist. Bevorzugte spezifische Bindungspaarmitglieder sind Proteine, die nicht kovalent an niedermolekulare Liganden, wie z.B. Biotin, Arzneistoffhaptene und Fluoreszenzfarbstoffe (wie z.B. einen Anti-Fluorescein-Antikörper) binden. Repräsentative spezifische Bindungspaare sind in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4. Repräsentative spezifische Bindungspaare

Antigen	Antikörper
Biotin	Avidin (oder Streptavidin oder Antibiotin)
IgG*	Protein A oder Protein G
Arzneistoff	Arzneistoffrezeptor

Toxin	Toxinrezeptor
Kohlenhydrat	Lectin oder Kohlenhydratrezeptor
Peptid	Peptidrezeptor
Protein	Proteinrezeptor
Enzymsubstrat	Enzym
DNA (RNA)	aDNA (aRNA) †
Hormon	Hormonrezeptor
Ion	Chelator
Psoralen	Nukleinsäure
Zielmolekül	RNA- oder DNA-Aptamer

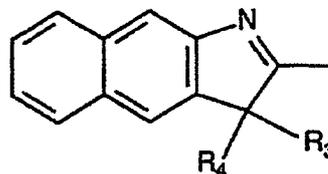
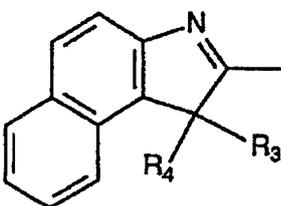
* IgG ist ein Immunoglobulin

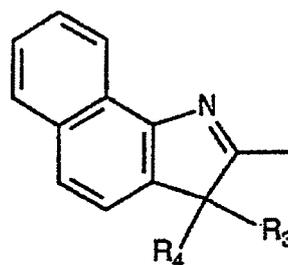
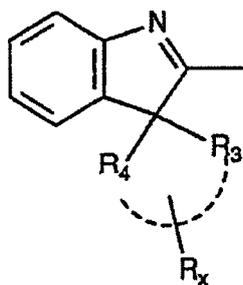
† aDNA und aRNA sind die zur Hybridisierung verwendeten Antisens-Stränge (complementären Stränge).

[0060] In einem erfindungsgemäßen Aspekt wird die konjugierte Substanz ferner mit zusätzlichen Farbstoffgruppierungen markiert, sodaß Fluoreszenzenergie entweder von dem erfindungsgemäßen Farbstoff aufgenommen oder darauf übertragen wird.

Synthese

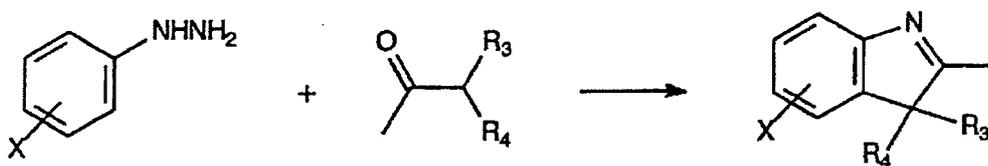
[0061] Die Synthese der erfindungsgemäßen Carbocyaninfarbstoffe hängt dort, wo die Anbindung an die 3-Stellung des Indoliums erfolgt, von der ursprünglichen Herstellung bestimmter Schlüsselzwischenverbindungen ab. Die Zwischenverbindungen weisen die folgende allgemeine Struktur auf (der Einfachheit halber sind bis auf wenige Ausnahmen alle möglichen Substituenten als Wasserstoff dargestellt):





[0062] Diese Grundstrukturen werden gegebenenfalls weiter substituiert, und zwar während oder nach der Synthese, sodaß die entsprechenden Farbstoffsubstituenten mit der oben angegebenen Bedeutung erhalten werden.

[0063] Die neuartigen Zwischenverbindungen werden leicht in einer Umsetzung synthetisiert, die einer Fischer-Indolsynthese ähnlich ist (worin X für einen gewünschten Substituenten am erhaltenen Indolium, typischerweise Sulfo, steht und R³ sowie R⁴ die oben angegebenen Bedeutungen besitzen):



[0064] Bei dieser Reaktion wird ein entsprechend substituiertes Arylhydrazin, bei dem es sich typischerweise um ein Phenylhydrazin eines entsprechend substituierten Naphthylhydrazins handelt, mit einem entsprechend substituierten Methylketon unter Erhalt eines 3,3-disubstituierten 2-Methylindolderivats umgesetzt. Dabei wird einer der Substituenten in 3-Stellung als chemisch reaktive Gruppierung oder eine Gruppe, die in eine chemisch reaktive Gruppierung umgewandelt wird, wie beispielsweise ein Carbonsäurederivat (Beispiele 1, 2, 7), ein Alkohol (Beispiel 16) oder ein Amin (Beispiel 17) ausgewählt. Sie eignen sich insbesondere zur Nutzung eines sulfonierten Phenylhydrazinderivats (wie in Beispiel 1–3) oder eines sulfonierten Naphthylhydrazinderivats (wie in Beispiel 25) zur Erhöhung der Löslichkeit des endgültigen Farbstoffs. Das 3,3-disubstituierte 2-Methylindol wird dann am Stickstoffatom zu einem Indoliumderivat mit einem Alkylierungsmittel quaternisiert, bei dem es sich typischerweise um ein Alkylhalogenid, wie z.B. Ethyliodid, ein Alkylsulfonat, wie z.B. Methyl-p-toluolsulfonat (Beispiel 7), oder ein zyklisches Sulfonat, wie z.B. Propansulton oder Butansulton (Beispiele 2–3) handelt. Typischerweise werden die Indolium- oder Benzindolium-Schlüsselzwischenverbindungen ein- oder mehrmals vor und nach der Quaternisierung an R² und anschließender Kondensation mit der Benzazoliumgruppierung und Polymethingruppierung unter Bildung der betreffenden Farbstoffe sulfoniert. Verfahren zur Synthese von Farbstoffen, wobei n = 1, n = 2 bzw. n = 3 ist, sind in Beispielen 12, 8 bzw. 21 aufgeführt. Variationen dieser Verfahren sind im Fachgebiet allgemein bekannt und ergeben Substituenten an der Polymethinbrücke oder am Indolium- oder Benzoliumanteil der Farbstoffvorstufe.

[0065] Ein sinnvoller Syntheseweg zu den Azacarbocyaninfarbstoffen der vorliegenden Erfindung läßt sich in drei Teilen beschreiben, wobei der natürlichen Einteilung bei der Beschreibung der Verbindungen gefolgt wird. Im allgemeinen benötigt die Synthese dieser Farbstoffe drei Vorstufen: das entsprechende Benzazolium- oder Azabenzazoliumsalz (die Gruppierungen "A" und "B") sowie eine Quelle für den Polymethinspacer. Typischerweise wird jede Komponente so ausgewählt, daß sie die entsprechenden chemischen Substituenten oder funktionelle Gruppen, die in die entsprechenden Substituenten umgewandelt werden können, beinhaltet. Die Chemie, die für die Herstellung und Kombination dieser Vorstufen benötigt wird, sodaß die jeweils betreffenden Derivate erhalten werden, wird allgemein vom Fachmann gut verstanden. Zwar gibt es vier mögliche Variationen, die ein gleichwertiges Ergebnis ergeben können, doch werden hier einige allgemeine Verfahren für deren Synthese und den Einbau chemischer Modifikationen vorbestellt.

[0066] Obwohl die hier beschriebenen Azacarbocyaninfarbstoffe und ihre Konjugate bislang noch nicht beschrieben wurden, wurden verschiedene nichtreaktive Azabenzazoliumderivate bereits beschrieben (siehe z.B. Brooker, et al., J. AM. CHEM. SOC., 64, 199(1942); Heravi, et al., INDIAN J. CHEM. 36B, 1025 (1997); Smith et al. SULFUR LETTERS 17, 197 (1994); Chu-Moyer et al. J. ORG. CHEM. 60, 5721 (1995); Turner, J. ORG. CHEM. 48, 3401 (1983); Couture et al. J. HETEROCYCLIC CHEM. 24, 1765 (1987); Petric et al. J. HETEROCYCLIC CHEM. 14, 1045, (1977); Barlin et al. AUST. J. CHEM. 37, 1729 (1984); Saikachi et al. CHEM. & PHARM. BULL. 9, 941 (1961); Barlin AUST. J. CHEM. 36, 983 (1983); Foye et al., J. PHARM. SCI. 64, 1371

(1975); Khanna et al. J. ORG. CHEM. 60, 960 (1995)); Britisches Patent Nr. 870,753 an Ficken et al. (1961); Ficken et al., "Diazaindenes and Their Quaternary Salts-Part I" S. 3202–3212 (1959); Ficken et al., "Diazaindenes and Their Quaternary Salts-Part II" S.584–588 (1961). Syntheseverfahren zur Herstellung einiger Azabenzazoliumvorstufen wurden ebenso in der gleichzeitig anhängigen Anmeldung mit der Seriennr. 09/557,275 von Haugland et al., eingereicht am 24. April 2000, US-Patent 6,664,047, beschrieben.

[0067] Die Substituenten an den aromatischen Kohlenstoffatomen der Azabenzazoliumgruppierung werden typischerweise vor der Quaternisierung mit einem Alkylierungsmittel in das Aza- oder Polyazabenzazol-Ausgangsmolekül eingebaut. Allerdings können derartige Substituenten auch während der Synthese der Azabenzazolgruppierung eingebaut werden. R^2/R^{12} wird üblicherweise durch Alkylierung des Ausgangsheterozyklus mit einem Alkylierungsmittel, das die gewünschte R^2/R^{12} -Gruppierung beinhaltet, erhalten.

[0068] Die Zwischenverbindung der Gruppierung B ist gegebenenfalls eine Azabenzazoliumvorstufe, wie oben beschrieben, oder eine Benzazoliumvorstufe, wie sie im Fachgebiet allgemein bekannt ist (z.B. US-Patent Nr. 5,436,134 an Haugland et al., (1995). Die Gruppierung B wird gegebenenfalls an zusätzliche Ringe kondensiert, was zu Farbstoffen führt, die bei längeren Wellenlängen absorbieren und emittieren (siehe z.B. US-Patent 6,027,709 an Little et al. (2000)).

[0069] Alkyl-, Alkoxy-, Carboxyl- und Halogensubstituenten an aromatischen Kohlenstoffatomen sind typischerweise bereits als Substituenten an den Benzazol- oder Azabenzazolvorstufen oder an Verbindungen, die leicht in solche Vorstufen mit im Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren umgewandelt werden, vorhanden. Dabei werden Sulfonsäuregruppen typischerweise vor der Kondensation des Cyaninfarbstoffs in die Vorstufen eingeführt (siehe z.B. US-Patent 5,767,287 an Bobrow et al. (1998)). Aminoalkylgruppen werden typischerweise bei ihrer Einführung zunächst mit einer Schutzgruppe substituiert, typischerweise durch Substitution an der Benzazol- oder Azabenzazolvorstufe. Die Schutzgruppe wird dann nach Kondensation des Cyaninfarbstoffs entfernt. Aromatische Aminogruppen werden typischerweise durch Reduktion einer nitrosubstituierten Benzazoliumvorstufe hergestellt, die wiederum durch Nitrierung der Benzazolvorstufe hergestellt wird.

[0070] Die Gruppierung BRIDGE stammt typischerweise von dem bei der Konstruktion des Farbstoffs verwendeten Kupplungsmittels. So ergibt beispielsweise N,N'-Diphenylformamidin bzw. Triethylorthoformiat BRIDGE-Gruppierungen, wobei A und B jeweils gleich 0 ist. Malonaldehyd-bis(phenylimin)hydrochlorid, 1,1,3-Trimethoxypropan sowie 1,1,3,3-Tetramethoxypropan ergeben Farbstoffe, wobei a oder b gleich 1 ist, und Glutaconaldehyddianilmonochlorid ergibt Farbstoffe, wobei a und b jeweils gleich 1 ist.

[0071] Die Syntheseverfahren für Farbstoffe, die verschiedene reaktive Gruppen enthalten, wie beispielsweise die in Tabelle 2 beschriebenen, sind im Fachgebiet gut dokumentiert. Insbesondere eignen sich aminreaktive Farbstoffe, wie z.B. "aktivierte Ester" von Carbonsäuren, die typischerweise durch Kopplung einer Carbonsäure an eine relativ saure "Abgangsgruppe" synthetisiert werden. Zu weiteren bevorzugten aminreaktiven Gruppen gehören Sulfonylhalogenide, die aus Sulfonsäuren unter Verwendung eines Halogenierungsmittels, wie z.B. PCl_5 oder $POCl_3$, hergestellt werden, Halogentriazine, die durch Umsetzung von Cyanurhalogeniden mit Aminen hergestellt werden, sowie Isothiocyanate oder Thiocyanate, die aus Aminen bzw. Phosgen oder Thiophosgen hergestellt werden.

[0072] Amide und Hydrazide enthaltende Farbstoffe eignen sich insbesondere zur Konjugation an Carbonsäuren, Aldehyde und Ketone. Diese werden am häufigsten durch Umsetzung eines aktivierten Esters einer Carbonsäure oder eines Sulfonylhalogenids mit einem Diamin, wie z.B. Cadaverin, oder mit einem Hydrazin synthetisiert. Als Alternative werden aromatische Amine häufig durch chemische Reduktion einer nitroaromatischen Verbindung synthetisiert. Amine und Hydrazine sind besonders geeignete Vorstufen zur Synthese Thiol-reaktiver Halogenacetamide oder Maleimide mit Standardverfahren.

[0073] Mit erfindungsgemäßen Farbstoffen markierte Nukleoside und Nukleotide eignen sich insbesondere für einige Anwendungen der Nukleinsäuremarkierung. Die Verwendung von Carbocyaninamiditen zur Markierung von Nukleotiden und Nukleosiden wurde bereits beschrieben (U.S. 5,986,086 an Bruch et al. (1999); U.S. 5,808,044 an Brush et al. (1998); U.S. 5,556,959 an Brush et al. (1996)).

[0074] Beispiele für einige Synthesestrategien für ausgewählte erfindungsgemäße Farbstoffe werden ebenso wie deren Charakterisierung, synthetische Vorstufen, Konjugate und Verwendungsverfahren in den Beispielen unten bereitgestellt. Weitere Modifikationen und Permutationen sind für den Fachmann naheliegend.

[0075] In einem erfindungsgemäßen Aspekt werden die erfindungsgemäßen Farbstoffverbindungen zur direkten Anfärbung oder Markierung einer Probe verwendet, sodaß die Probe identifiziert oder quantifiziert werden kann. So können beispielsweise derartige Farbstoffe als Teil eines Tests für einen biologischen Zielanalyt, als nachweisbares Tracer-Element in einer biologischen oder nichtbiologischen Flüssigkeit oder für solche Zwecke wie photodynamische Therapie von Tumoren, bei der eine gefärbte Probe zur selektiven Zerstörung von Tumorzellen und -geweben bestrahlt wird, oder zur Photoablation von arteriellen Plaque oder Zellen, üblicherweise über die photosensibilisierte Produktion von Singulett-Sauerstoff, zugegeben werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Farbstoffkonjugat zur Anfärbung einer Probe verwendet, die einen Liganden umfaßt, für den die konjugierte Substanz ein komplementäres Mitglied eines spezifischen Bindungspaares darstellt (z.B. Tabelle 4).

[0076] In einem erfindungsgemäßen Aspekt wird die Probe direkt aus einer flüssigen Quelle oder in Form einer Waschflüssigkeit aus festem Material (organisch oder anorganisch) oder einem Wachstumsmedium, in das Zellen zur Kultivierung eingeführt wurden, oder einer Pufferlösung, in der Zellen zur Beurteilung planiert wurden, gewonnen. Umfaßt die Probe Zellen, so handelt es sich bei den Zellen gegebenenfalls um Einzelzellen, einschließlich Mikroorganismen, oder um mehrere, mit anderen Zellen in zwei- oder dreidimensionalen Schichten assoziierte Zellen, einschließlich vielzelliger Organismen, Embryos, Geweben, Biopsien, Filamenten, Biofilmen usw.

[0077] Als Alternative handelt es sich bei der Probe um einen Feststoff, gegebenenfalls um einen Abstrich oder eine Ausschabung oder ein aus einer Flüssigkeit oder Dampf durch Filtration abgetrenntes Retentat. In einem erfindungsgemäßen Aspekt wird die Probe aus einer biologischen Flüssigkeit, einschließlich getrennter oder unfiltrierter biologischer Flüssigkeiten, wie beispielsweise Urin, Liquor, Blut, Lymphflüssigkeiten, Gewebehomogenat, interstitieller Flüssigkeit, Zellextrakten, Schleim, Speichel, Sputum, Stuhl, physiologischen Ausscheidungen oder anderen ähnlichen Flüssigkeiten gewonnen. Alternativ wird die Probe aus einer Umweltquelle, wie beispielsweise Erdboden, Wasser oder Luft, oder aus einer großtechnischen Quelle gewonnen, beispielsweise einem Abwasserstrom, einer Wasserquelle, einer Zuleitung oder einer Produktionscharge entnommen.

[0078] In noch einer weiteren Ausführungsform liegt die Probe auf oder in einer festen oder halbfesten Matrix vor. In einem erfindungsgemäßen Aspekt handelt es sich bei der Matrix um eine Membran. In einem weiteren Aspekt handelt es sich bei der Matrix um ein Elektrophoresegel, wie es zur Trennung und Charakterisierung von Nukleinsäuren oder Proteinen verwendet wird, oder einen Blot, der durch Übertragung von einem Elektrophoresegel auf eine Membran hergestellt wird. In einem weiteren Aspekt handelt es sich bei der Matrix um einen Siliciumchip oder einen Glasobjektträger, wobei der interessierende Analyt auf dem Chip bzw. dem Objektträger in einem Array immobilisiert wurde (z.B. die Probe umfaßt Proteine oder Nukleinsäurepolymere in einem Mikroarray). In noch einem weiteren Aspekt handelt es sich bei der Matrix um eine "Microwell"-Platte oder einen mikrofluidischen Chip, wobei die Probe mit automatischen Verfahren, typischerweise mit verschiedenen Verfahren eines Screening mit hohem Durchsatz, wie beispielsweise Arzneistoff-Screening, analysiert wird.

[0079] Die erfindungsgemäßen Farbstoffverbindungen werden im allgemeinen dahingehend verwendet, daß man eine erfindungsgemäße Farbstoffverbindung wie oben beschrieben mit der interessierenden Probe unter zur Erhaltung einer nachweisbaren optischen Reaktion ausgewählten Bedingungen zusammenbringt. Dabei bezieht sich der Begriff "Farbstoffverbindung", wie er hier verwendet wird, auf alle Aspekte der beanspruchten Farbstoffe, einschließlich sowohl reaktiver Farbstoffe als auch Farbstoffkonjugate. Die Farbstoffverbindung bildet typischerweise eine kovalente oder nichtkovalente Assoziation oder einen kovalenten oder nichtkovalenten Komplex mit einem Element der Probe oder ist einfach innerhalb der Grenzen der Probe oder eines Anteils der Probe vorhanden. Die Probe wird dann bei einer für das Hervorrufen der optischen Reaktion ausgewählten Wellenlänge bestrahlt. Typischerweise wird die Anfärbung der Probe zur Bestimmung einer spezifischen Eigenschaft der Probe verwendet, indem man ferner die optische Reaktion mit einer Standardreaktion oder erwarteten Reaktion vergleicht.

[0080] Dabei versteht man unter einer nachweisbaren optischen Reaktion eine Veränderung oder das Auftreten eines optischen Signals, das entweder durch Beobachtung oder instrumentell nachweisbar ist. Typischerweise handelt es sich bei der nachweisbaren Reaktion um eine Fluoreszenzänderung, wie beispielsweise eine Änderung der Intensität, der Excitations- oder Emissionswellenlängenverteilung der Fluoreszenz, der Fluoreszenzlebensdauer, der Fluoreszenzpolarisierung oder einer Kombination daraus. Das Ausmaß und/oder die Lo-

kalisierung der Anfärbung deutet im Vergleich mit einer Standard- oder erwarteten Reaktion an, ob und zu welchem Grad die Probe eine gegebene Eigenschaft besitzt. Auch wenn manche erfindungsgemäße Farbstoffe nur eine geringe Fluoreszenzemission zeigen, eignen sie sich dennoch als chromophore Farbstoffe. Derartige Chromophore eignen sich als Energieakzeptoren bei FRET-Anwendungen oder dazu, einer Probe oder einem Anteil einer Probe die gewünschte Farbe zu verleihen.

[0081] Für biologische Anwendungen werden die erfindungsgemäßen Farbstoffverbindungen typischerweise in einer wäßrigen, hauptsächlich wäßrigen oder mit Wasser mischbaren Lösung verwendet, die gemäß im Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren hergestellt wird. Die genaue Konzentration der Farbstoffverbindung hängt von den experimentellen Bedingungen sowie den gewünschten Ergebnissen ab, liegt jedoch typischerweise in einem Bereich von etwa einem Nanomolar bis ein Millimolar oder höher. Die optimale Konzentration wird durch systematisches Variieren bis zum Erreichen zufriedenstellender Ergebnisse mit minimaler Hintergrundfluoreszenz bestimmt.

[0082] Die Farbstoffverbindungen werden höchst vorteilhaft zur Anfärbung von Proben mit biologischen Komponenten verwendet. Die Probe kann dabei heterogene Gemische von Komponenten (einschließlich intakten Zellen, Zellextrakten, Bakterien, Viren, Organellen und Gemischen davon) oder eine einzige Komponente bzw. homogene Gruppe von Komponenten (z.B. natürliche oder synthetische Aminosäure-, Nukleinsäure- oder Kohlenhydratpolymere oder Lipidmembrankomplexe) umfassen. Diese Farbstoffe sind im allgemeinen gegenüber lebenden Zellen und anderen biologischen Komponenten im Rahmen der Verwendungskonzentrationen nicht toxisch.

[0083] Die Farbstoffverbindung wird mit der Probe so zusammengebracht, daß dadurch der Kontakt zwischen der Farbstoffverbindung und den interessierenden Probenbestandteilen erleichtert wird. Typischerweise wird dabei die Farbstoffverbindung oder eine die Farbstoffverbindung enthaltende Lösung einfach zu der Probe gegeben. Bestimmte erfindungsgemäße Farbstoffe, insbesondere diejenigen, die mit einer oder mehreren Sulfonsäuregruppierungen substituiert sind, neigen dazu, Membranen biologischer Zellen nicht durchdringen zu können und werden, wenn sie einmal im Inneren der lebensfähigen Zellen sind, typischerweise gut zurückgehalten. Zur Einführung ausgewählter Farbstoffverbindungen in Zellen können Behandlungen verwendet werden, mit denen die Plasmamembran permeabilisiert wird, wie z.B. Elektroporation, Schockbehandlungen oder hohe extrazelluläre ATP-Konzentration. Als Alternative lassen sich ausgewählte Farbstoffverbindungen physisch in Zellen einführen, beispielsweise durch Mikroinjektion unter Druck, "Scrape Loading", "Patch Clamp"-Verfahren oder Phagozytose.

[0084] Farbstoffe, in denen ein aliphatisches Amin oder ein Hydrazinrest eingebaut ist, lassen sich in Zellen mikroinjizieren, wo sie dann an Ort und Stelle mit Aldehydfixiermitteln, wie z.B. Formaldehyd oder Glutaraldehyd, fixiert werden können. Diese Fixierbarkeit führt dazu, daß sich solche Farbstoffe für intrazelluläre Anwendungen, wie beispielsweise neuronales "Tracing" eignen.

[0085] Farbstoffverbindungen, die einen lipophilen Substituenten besitzen, wie z.B. Phospholipide, lassen sich nicht kovalent in Lipidanordnungen einbauen, beispielsweise zur Verwendung als Sonden für die Membranstruktur oder zum Einbau in Liposome, Lipoproteine, Filme, Kunststoffe, lipophile Mikrokügelchen oder ähnliche Materialien oder zum Tracing. Lipophile Farbstoffe eignen sich als Fluoreszenzsonden der Membranstruktur.

[0086] Chemisch reaktive Farbstoffverbindungen binden kovalent an eine entsprechende funktionelle Gruppe auf vielen verschiedenen Materialien, wobei Farbstoffkonjugate wie oben beschrieben gebildet werden. Die Verwendung von Farbstoffverbindungen zur Markierung reaktiver Stellen auf der Oberfläche von Zellen, in Zellmembranen oder intrazellulären Kompartimenten, wie z.B. Organellen, oder im Cytoplasma der Zelle, gestattet die Bestimmung des Vorhandenseins oder der Menge, der Zugänglichkeit oder der räumlichen und zeitlichen Verteilung davon in der Probe. Fotoreaktive Farbstoffe lassen sich auf ähnliche Weise zur Fotomarkierung von Bestandteilen der äußeren Membran biologischer Zellen oder als photofixierbare polare Tracer für Zellen verwenden.

[0087] Gegebenenfalls wird die Probe nach der Anfärbung gewaschen, um verbliebene, überschüssige oder nicht gebundene Farbstoffverbindung zu entfernen. Die Probe wird gegebenenfalls mit einer oder mehreren anderen Lösungen im Laufe der Färbung kombiniert, einschließlich Waschlösungen, Permeabilisierungs- und/oder Fixierlösungen sowie Lösungen, die zusätzliche Nachweisreagentien enthalten. Dabei produziert ein zusätzliches Nachweisreagens typischerweise eine nachweisbare Reaktion aufgrund des Vorhandenseins eines spezifischen Zellbestandteils, einer intrazellulären Substanz oder eines Zellzustands gemäß im Fachge-

biet allgemein bekannter Verfahren. Weist das zusätzliche Nachweisreagens Spektraleigenschaften auf, die sich von denen der betreffenden Farbstoffverbindungen unterscheiden, oder ergibt ein Produkt mit solchen Spektraleigenschaften, so sind Anwendungen mit mehreren Farben möglich. Dies ist insbesondere dort sinnvoll, wo es sich bei dem zusätzlichen Nachweisreagens um einen Farbstoff oder ein Farbstoffkonjugat der vorliegenden Erfindung mit Spektraleigenschaften, die sich von denen des Anfärbungsfarbstoffs nachweisbar unterscheiden, handelt.

[0088] Die erfindungsgemäßen Verbindungen, bei denen es sich um Farbstoffkonjugate handelt, werden gemäß im Fachgebiet ausgiebig bekannter Verfahren verwendet; z.B. Verwendung von Antikörperkonjugaten in mikroskopischen und Immunfluoreszenztests; sowie Nukleotid- oder Oligonukleotidkonjugate für Nukleinsäurehybridisierungstests und Nukleinsäuresequenzierung (z.B. US-Patente Nr. 5,332,666 an Prober et al. (1994); 5,171,534 an Smith, et al. (1992); 4,997,928 an Hobbs (1991); und WO-Anmeldung 94/05688 an Menchen et al.). Farbstoffkonjugate mit mehreren unabhängigen erfindungsgemäßen Farbstoffen besitzen einen Nutzen für Anwendungen mit mehreren Farben.

[0089] Zu einem beliebigen Zeitpunkt nach oder während der Anfärbung wird die Probe mit einer zum Erhalt einer nachweisbaren optischen Reaktion ausgewählten Lichtwellenlänge bestrahlt und mit einem Mittel zum Nachweis der optischen Reaktion beobachtet. Als Geräte zur Bestrahlung der erfindungsgemäßen Farbstoffverbindungen eignen sich unter anderem, ohne darauf beschränkt zu sein, Ultraviolett-Handlampen, Quecksilberbogenlampen, Xenonlampen, Laser und Laserdioden. Diese Bestrahlungsquellen sind gegebenenfalls in Laser-Scanner, Fluoreszenzmikroplatten-Ablesegeräte, Standard- oder Minifluorometer oder chromatographische Detektoren integriert. Bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsformen sind Farbstoffe, die bei oder nahe den Wellenlängen 633–636 nm, 647 nm, 660 nm, 680 nm und oberhalb 700 nm angeregt werden können, da diese Bereiche mit der Ausgangsleistung relativ kostengünstiger Anregungsquellen gut übereinstimmen.

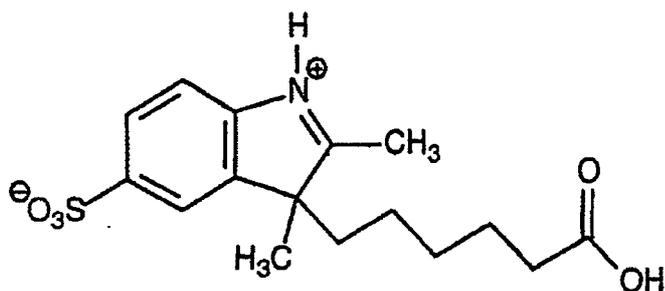
[0090] Die optische Reaktion wird gegebenenfalls durch visuelle Inspektion oder durch Verwendung einer der folgenden Vorrichtungen nachgewiesen: CCD-Kameras, Videokameras, photographischer Film, Laser-Scanning-Vorrichtungen, Fluorometer, Photodioden, Quantenzähler, Epifluoreszenzmikroskope, Scanning-Mikroskope, Durchflußcytometer, Fluoreszenzmikroplatten-Ablesegeräte, oder mit Mitteln zur Signalverstärkung, wie beispielsweise Photomultiplier-Röhren. Wird die Probe mit einem Durchflußcytometer untersucht, so umfaßt die Untersuchung der Probe gegebenenfalls das Sortieren von Anteilen der Probe gemäß deren Fluoreszenzreaktion.

Kits

[0091] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Formulierung von Kits, die die praktische Durchführung verschiedener Tests unter Verwendung eines der erfindungsgemäßen Farbstoffe, wie oben beschrieben, erleichtern. Dabei umfassen die erfindungsgemäßen Kits typischerweise einen erfindungsgemäßen gefärbten oder Fluoreszenzfarbstoff, der entweder als eine chemisch reaktive Markierung, die sich zur Herstellung von Farbstoffkonjugaten eignet, oder als ein Farbstoffkonjugat, worin die konjugierte Substanz ein spezifisches Bindungspaarmitglied oder ein Nukleosid, Nukleotid, Oligonukleotid, Nukleinsäurepolymer, Peptid oder Protein darstellt, vorliegt. Der Kit umfaßt gegebenenfalls ferner ein oder mehrere Puffermittel, die typischerweise in Form einer wäßrigen Lösung vorliegen. Die erfindungsgemäßen Kits umfassen gegebenenfalls ferner zusätzliche Nachweisreagentien, ein Reinigungsmedium zur Aufreinigung der erhaltenen markierten Substanz, Lumineszenzstandards, Enzyme, Enzyminhibitoren, organisches Lösungsmittel, bzw. Anleitungen zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Tests.

[0092] Die nachfolgenden Beispiele sind zur Veranschaulichung der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung angegeben und sollen keine Beschränkung oder Definition des gesamten Umfangs der vorliegenden Erfindung darstellen.

Beispiel 1. Darstellung von 3-(5-Carboxypentyl)-2,3-dimethyl-5-sulfoindolium, inneres Salz (Verbindung 1)

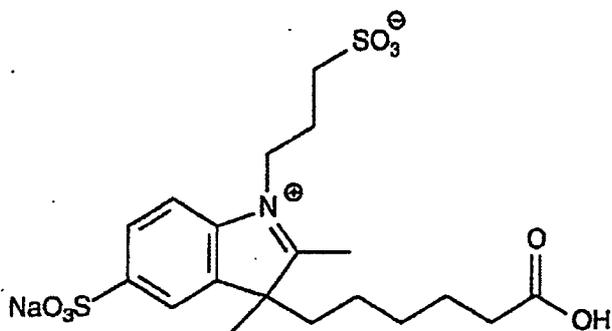


Verbindung 1

[0093] Ein Gemisch aus 25 g 2-Methylacetoessigsäureethylester, 64 ml einer 21%igen Natriummethylatlösung in Ethanol sowie 34 ml 6-Bromhexansäureethylester werden am Rückfluß in 200 ml Ethanol über Nacht erhitzt. Das Gemisch wird filtriert und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wird zwischen 1 M HCl und Chloroform verteilt. Die organische Schicht wird über Magnesiumsulfat getrocknet und an Kieselgel mit 1:10 Essigester/Hexan als Elutionsmittel gereinigt, sodaß 22 g 2-(5-Carboxypentyl)-2-methylacetoessigsäureethylester erhalten werden.

[0094] Der so erhaltene Acetoessigester wird in 300 ml Methanol gelöst und mit einer Lösung aus 10 g NaOH in 100 ml Wasser versetzt. Das Gemisch wird bei 50°C über Nacht erhitzt. Die Lösung wird auf ~50 ml eingedampft, auf ungefähr ~pH 1 angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die organische Schicht wird über MgSO₄ getrocknet und eingedampft, sodaß 13,5 g 7-Methyl-8-oxononansäure erhalten werden. Die Nonansäure wird am Rückfluß in 110 ml Essigsäure mit 13,5 g 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure 5 Stunden erhitzt. Die Essigsäure wird abgedampft und das Produkt an Kieselgel unter Erhalt von 23 g des Produkts aufgereinigt.

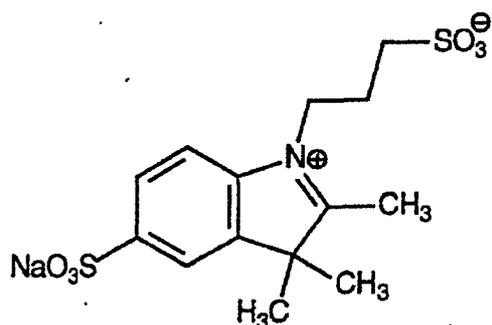
Beispiel 2. Darstellung von 2,3-Dimethyl-3-(5-carboxypentyl)-5-sulfo-1-(3-sulfopropyl)indolium, Natriumsalz (Verbindung 2)



Verbindung 2

[0095] Zu einer Methanollösung von 11 g Verbindung 1 gibt man 3,4 g wasserfreies Natriumacetat. Das Gemisch wird 5 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und das erhaltene Natriumsalz mit 24,4 g Propansulton 1 Stunde bei 110°C zur Erzeugung des Produkts erhitzt.

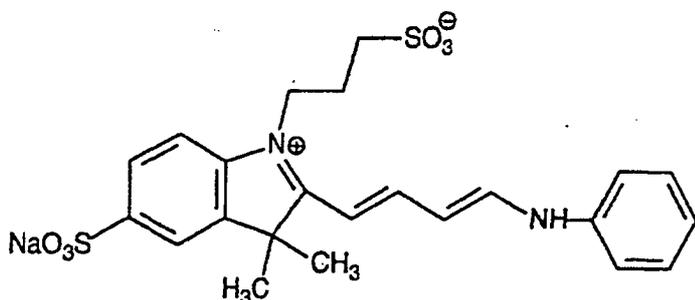
Beispiel 3. Darstellung von 5-Sulfo-1-(3-sulfopropyl)-2,3,3-trimethylindolium, Natriumsalz (Verbindung 3A) und 5-Sulfo-1-(3-sulfopropyl)-1,2,3,3-tetramethylindolium, Natriumsalz (Verbindung 3B)



Verbindung 3

[0096] 15 g 5-Sulfo-2,3,3-trimethylindolium, inneres Salz (Mujumdar, et al. BIOCONJUGATE CHEMISTRY 4, 105 (1993)) in 60 ml Methanol werden mit 5,67 g Natriumacetat versetzt. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wird die Lösung eingeeengt. Der schaumige Feststoff wird pulverisiert, in 60 ml Acetonitril gelöst und mit 23 g Propansulfon 15 min gerührt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand bei 110°C getrocknet, sodaß 5-Sulfo-1-(3-sulfopropyl)-2,3,3-trimethylindolium, Natriumsalz (Verbindung 3A) erhalten wird. 5-Sulfo-1,2,3,3-tetramethylindolium, (Verbindung 3B) wird auf ähnliche Weise dargestellt, außer daß dabei Methyl-p-toluolsulfonat anstelle von Propansulfon eingesetzt wird.

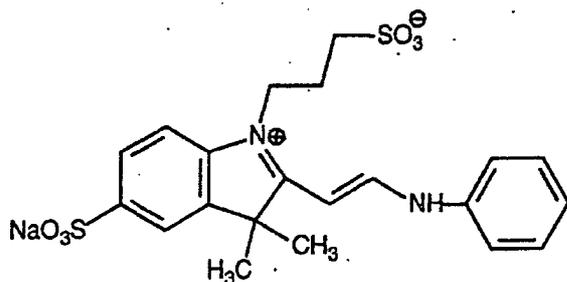
Beispiel 4. Darstellung von 2-(4-Anilinobutadienyl)-3,3-dimethyl-5-sulfo-1-(3-sulfopropyl)indolium, Natriumsalz (Verbindung 4)



Verbindung 4

[0097] Verbindung 3A (15 g) wird mit 21,5 g Malonaldehyddianilhydrochlorid und 0,4 ml Triethylamin in 200 ml Essigsäure eine Stunde bei 110°C erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand an Kieselgel unter Erhalt von 1,39 g des Produkts aufgereinigt.

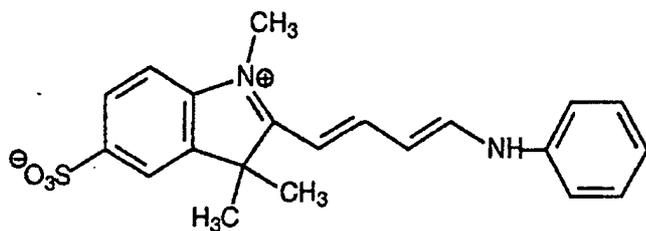
Beispiel 5. Darstellung von 2-(Anilinovinyl)-3,3-dimethyl-5-sulfo-1-(3-sulfopropyl)indolium, Natriumsalz (Verbindung 5)



Verbindung 5

[0098] Ein Gemisch aus 5 g Verbindung 3A, 2,72 g N,N'-Diphenylformamidin sowie 0,52 ml Essigsäureanhydrid wird 30 Minuten bei 150°C erhitzt, anschließend eingeeengt und der Rückstand an Kieselgel aufgereinigt.

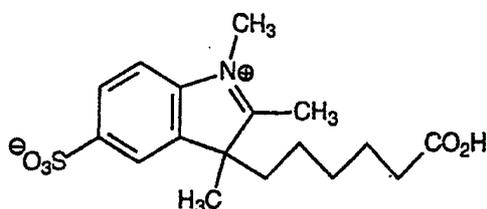
Beispiel 6. Darstellung von 2-(4-Anilinobutadienyl)-5-sulfo-1,3,3-trimethylindolium, inneres Salz (Verbindung 6)



Verbindung 6

[0099] Die Vorgehensweise ist die gleiche wie die zur Darstellung von Verbindung 4 verwendete, außer daß anstelle von Verbindung 3A Verbindung 3B eingesetzt wird.

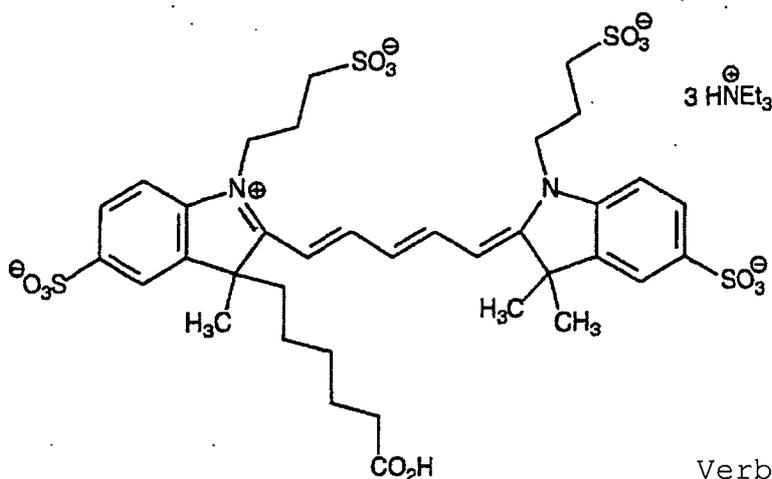
Beispiel 7. Darstellung von 3-(5-Carboxypentyl)-5-sulfo-1,2,3-trimethylindolium, inneres Salz (Verbindung 7)



Verbindung 7

[0100] Die Verbindung wird durch Erhitzen von Verbindung 1 mit 6 Äquivalenten p-Toluolsulfonsäuremethyl-ester über 1,5 Stunden bei 100°C dargestellt. Das Rohprodukt wird mit Essigester gefällt und an einer Kieselgelsäule aufgereinigt.

Beispiel B. Darstellung von Verbindung 8.

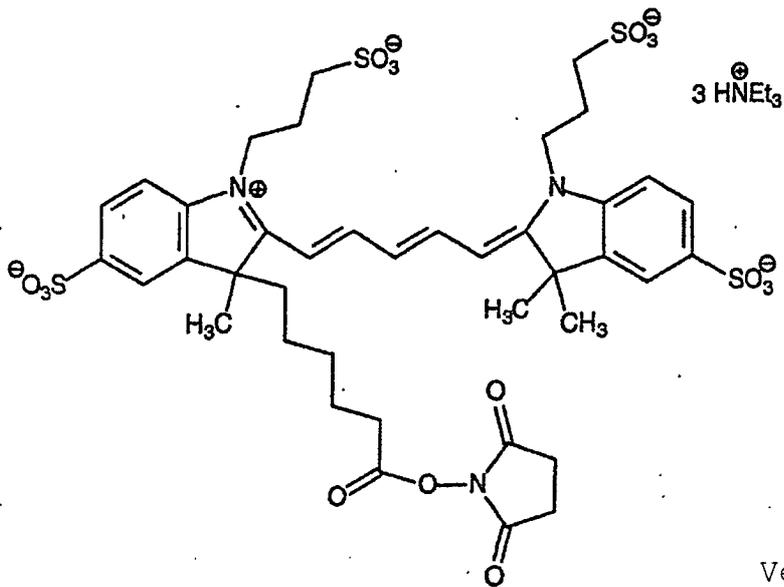


Verbindung 8

Verbindung 8

[0101] Verbindung 2 (1 g) und Verbindung 4 (1,5 g) werden mit 0,84 ml Triethylamin und 0,5 ml Essigsäureanhydrid zusammengegeben. Das Gemisch wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend eingeeengt und der Rückstand mit HPLC aufgereinigt.

Beispiel 9. Darstellung von Verbindung 9.

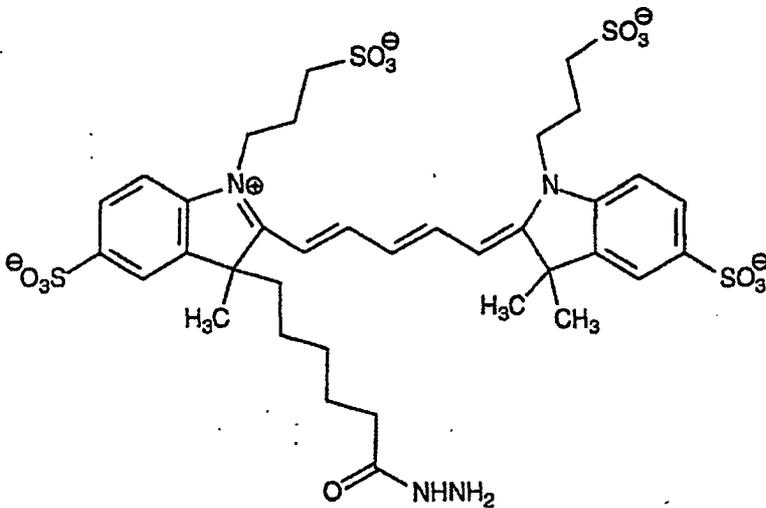


Verbindung 9

Verbindung 9

[0102] 55 mg Verbindung 8 in 1 ml DMF werden mit 0,034 ml Triethylamin und 21 mg 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorborat versetzt. Das Gemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und unter Erhalt des Succinimidylesters eingengt.

Beispiel 10. Darstellung von Verbindung 10.

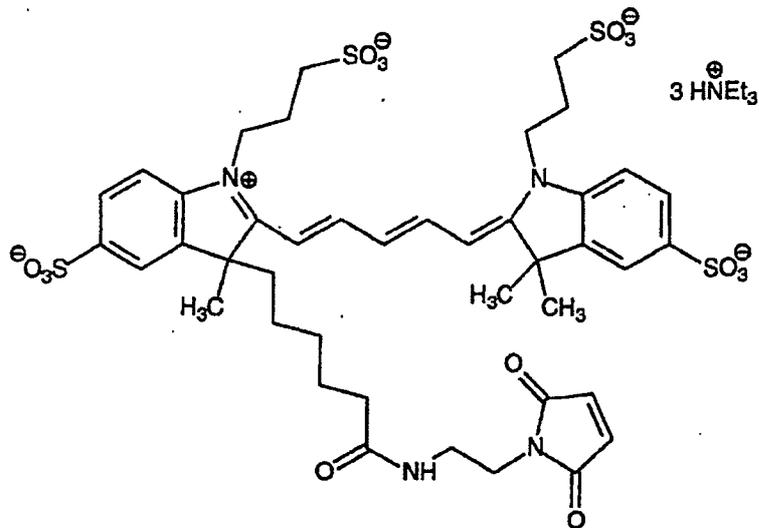


Verbindung 10

Verbindung 10

[0103] Verbindung 9 in Acetonitril wird mit 3 Äquivalenten Triethylamin und 1,2 Äquivalenten wasserfreiem Hydrazin versetzt. Das Gemisch wird bei Umgebungstemperatur 15 Minuten gerührt. Das Produkt wird mit 4 Volumen Essigester gefällt und mit HPLC aufgereinigt.

Beispiel 11. Darstellung von Verbindung 11.

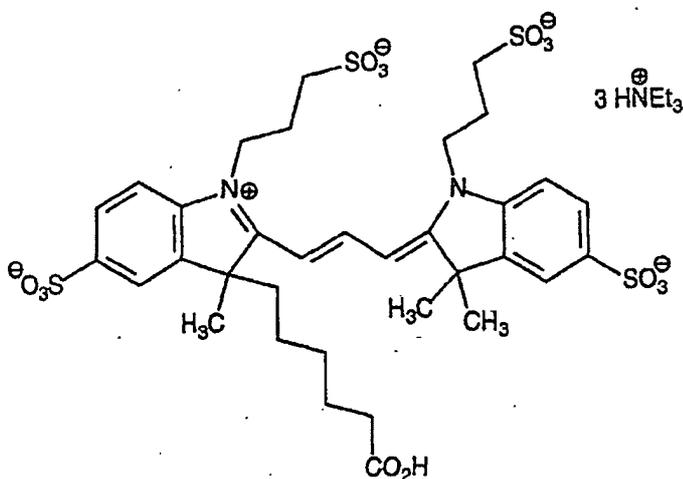


Verbindung 11

Verbindung 11

[0104] Verbindung 9 in Acetonitril wird bei Raumtemperatur mit 4 Äquivalenten Triethylamin und 1,2 Äquivalenten N-(2-Aminoethyl)maleimid, Trifluoressigsäuresalz, versetzt. Das Gemisch wird bei Umgebungstemperatur 15 Minuten gerührt. Das Produkt wird mit 4 Volumen Essigester gefällt und mit HPLC aufgereinigt.

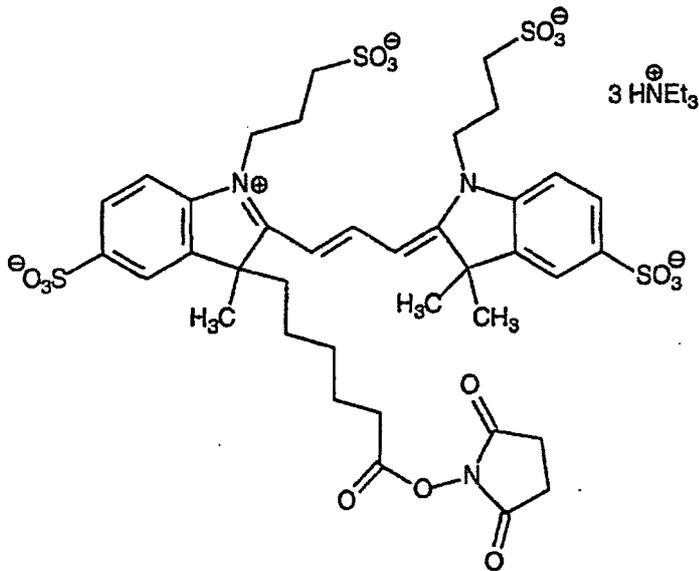
Beispiel 12. Darstellung von Verbindung 12.



Verbindung 12

[0105] 6 mmol Verbindung 2 werden mit 2 g Verbindung 5 in 20 ml DMF, 4,2 ml Triethylamin sowie 1,8 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend eingengt und der Rückstand mit HPLC aufgereinigt.

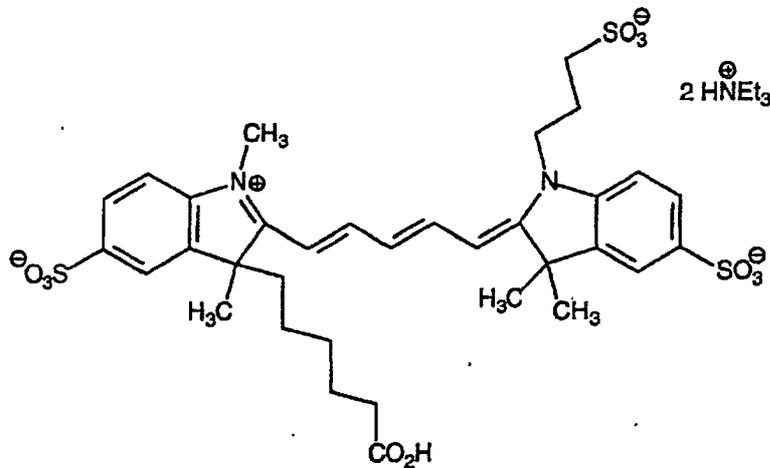
Beispiel 13. Darstellung von Verbindung 13.



Verbindung 13

[0106] Die hier verwendete Vorgehensweise ist ähnlich wie die zur Darstellung von Verbindung 9, wobei anstelle von Verbindung 8 Verbindung 12 verwendet wird.

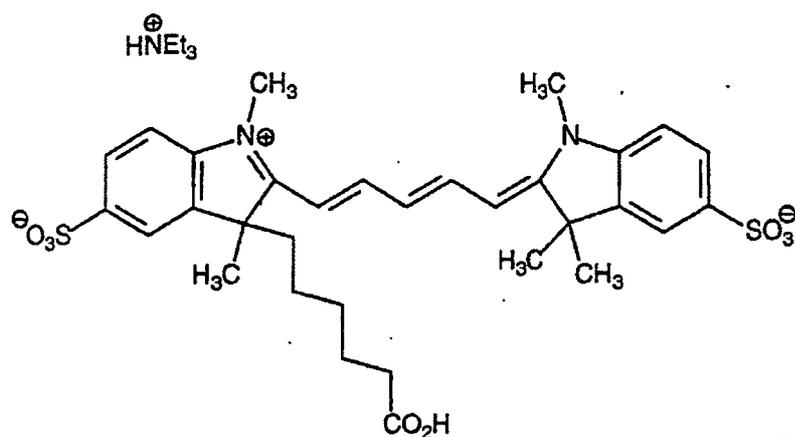
Beispiel 14. Darstellung von Verbindung 14.



Verbindung 14

[0107] Die Verbindung wird in DMF durch Mischen von jeweils einem Äquivalent Verbindung 4 und Verbindung 7 und anschließender Zugabe von vier Äquivalenten Triethylamin und 1,5 Äquivalenten Essigsäureanhydrid dargestellt. Nach 2 stündigem Rühren bei Raumtemperatur und Einengen wird der Rückstand mit HPLC aufgereinigt.

Beispiel 15. Darstellung von Verbindung 15.

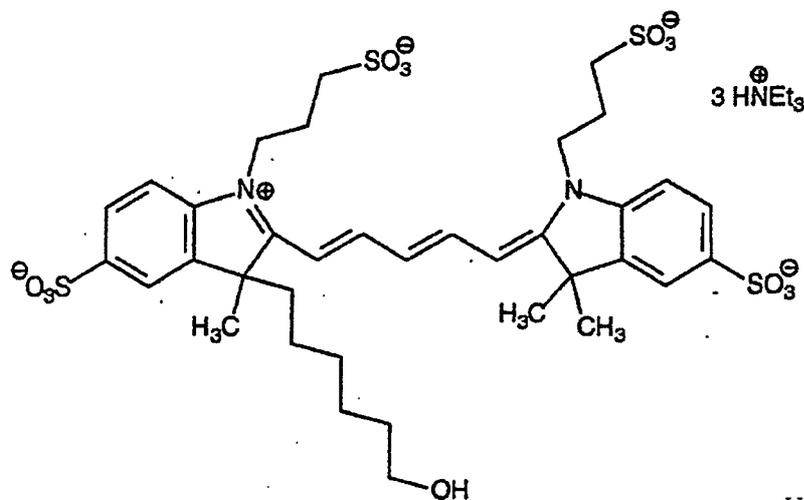


Verbindung 15

Verbindung 15

[0108] Ein Gemisch aus 0,27 g Verbindung 6 und 0,6 mmol Verbindung 7 in 8 ml DMF wird mit 0,42 ml Triethylamin und 0,1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Das Gemisch wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend eingengt und der Rückstand mit HPLC aufgereinigt.

Beispiel 16. Darstellung von Verbindung 16.

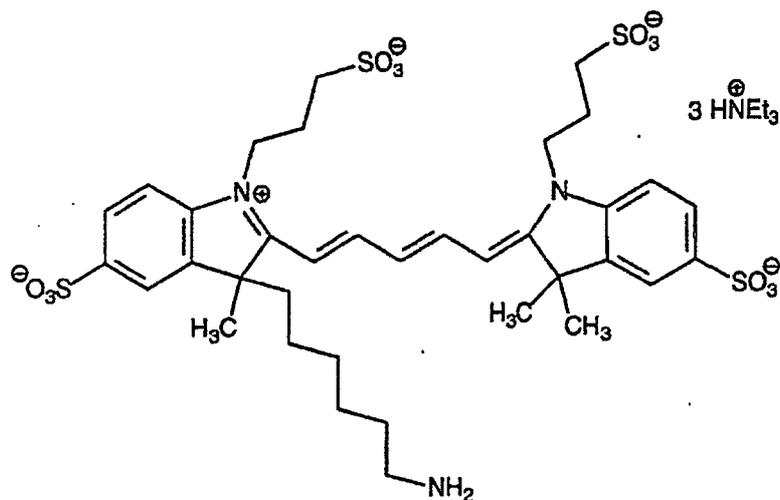


Verbindung 16

Verbindung 16

[0109] 2-Methylacetoessigsäureethylester wird mit 6-Benzoyloxy-1-bromhexan in Gegenwart von 1,2 Äquivalenten Natriumhydrid in THF alkyliert, wobei das erhaltene Produkt wie in Beispiel 1 in wäßrigem NaOH hydrolysiert und decarboxyliert wurde, um das gewünschte 9-Hydroxy-3-methyl-2-nonanon zu erzeugen. Das Nonanon wird dann am Rückfluß mit einem Äquivalent 4-Hydrazinbenzolsulfonsäure in Essigsäure zur Erzeugung von 3-(6-Hydroxyhexyl)-2,3-dimethyl-5-sulfoindolium, inneres Salz, erhitzt. Das Hydroxy wird wiederum in Form einer Benzoyloxygruppe geschützt, und diese Zwischenverbindung wird dann in die geschützte Form der Zielverbindung wie in Beispiel 8 transformiert. Anschließend wird die Benzoyl-Schutzgruppe mit verdünntem NaOH entfernt.

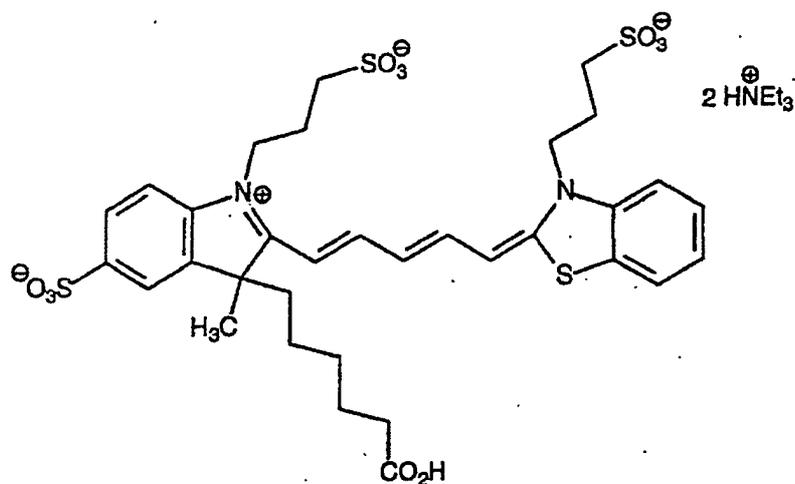
Beispiel 17. Darstellung von Verbindung 17.



Verbindung 17

[0110] Die Zwischenverbindung wird wie in Beispiel 16 dargestellt, außer daß anstelle von 6-Benzoyloxy-1-bromhexan 6-t-Butoxycarbonyloxy-1-bromhexan eingesetzt wird. Die t-BOC-Schutzgruppe wird mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur nach Bildung des Zielfarbstoffs abgetrennt.

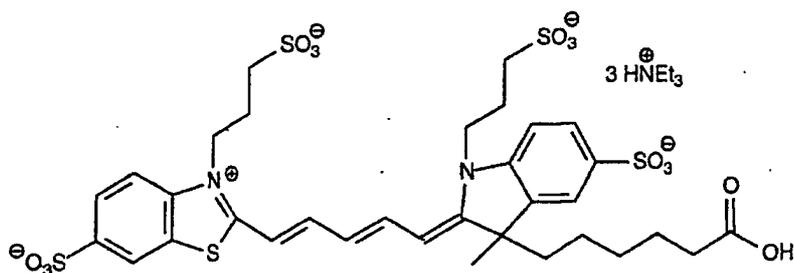
Beispiel 18. Darstellung von Verbindung 18.



Verbindung 18

[0111] 1 mmol 2-Methyl-1-(3-sulfopropyl)-benzothiazolium, inneres Salz (aus einstündigem Erhitzen von jeweils einem Äquivalent Propansulton und 2-Methylbenzothiazol bei 110°C) und 150 mg Verbindung 31 in 5 ml DMF werden mit 0,28 ml Triethylamin und 0,1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wird ein Stunde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend eingengt und der Rückstand mit HPLC aufgereinigt.

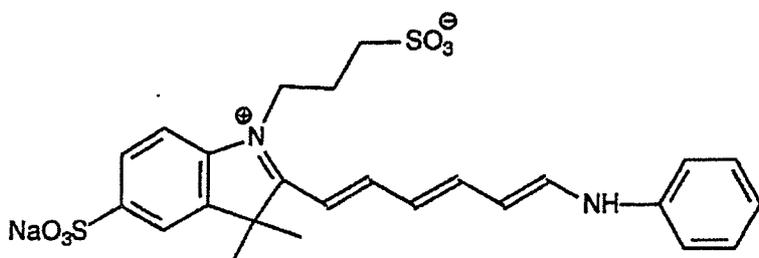
Beispiel 19. Darstellung von Verbindung 19.



Verbindung 19

[0112] Verbindung 19 wird auf die gleiche Weise wie Verbindung 18 dargestellt, außer daß man von 2-Methyl-6-sulfobenzothiazol ausgeht, das durch Umsetzung von Schwefelsäure und 2-Methylbenzothiazol bei Raumtemperatur dargestellt wird.

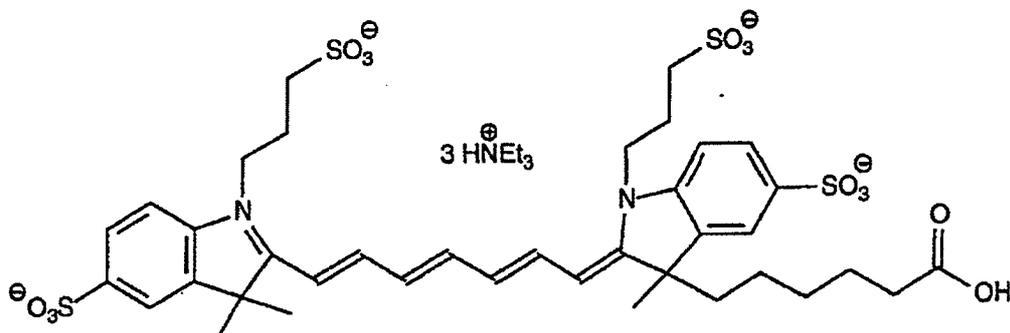
Beispiel 20. Synthese von 2-(6-Anilinohexatrienyl)-3,3-dimethyl-5-sulfo-1-(3-sulfopropylindolium), inneres Salz (Verbindung 20).



Verbindung 20

[0113] Ein Gemisch aus 1,9 g Verbindung 3A und 2,85 g N-(5-Anilino-2,4-pentadienyliden)anilin-hydrochlorid in 30 ml Essigsäureanhydrid wird 30 Minuten bei 120°C erhitzt. Am Ende dieses Zeitraums wird mit 90 ml Essigester versetzt und das Produkt filtriert und in diesem Zustand eingesetzt.

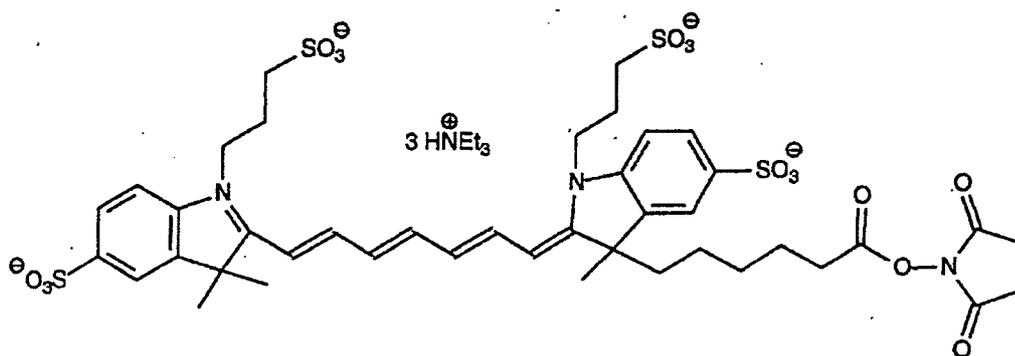
Beispiel 21. Synthese von Verbindung 21.



Verbindung 21

[0114] Ein Gemisch aus 1,05 g Verbindung 20, 2 mmol Verbindung 2, 10 ml DMF, 1,7 ml Triethylamin sowie 0,6 ml Essigsäureanhydrid wird über Nacht bei Raumtemperatur und danach zusätzlich 1,5 Stunden bei 35°C gerührt. Es wird mit 40 ml Essigester versetzt, und der Niederschlag wird mit HPLC aufgereinigt.

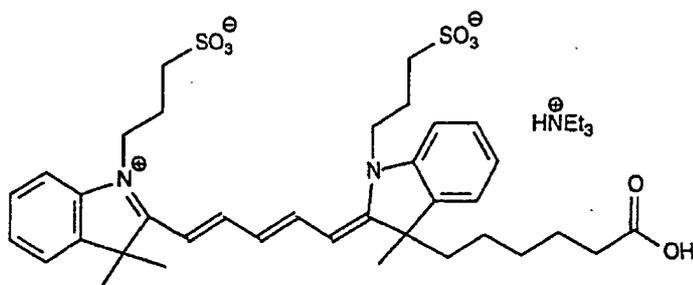
Beispiel 22. Synthese von Verbindung 22.



Verbindung 22

[0115] Der Succinimidylester von Verbindung 21 (Verbindung 22) wird wie in Beispiel 9 beschrieben dargestellt.

[0116] Beispiel 23. Synthese von Verbindung 23.



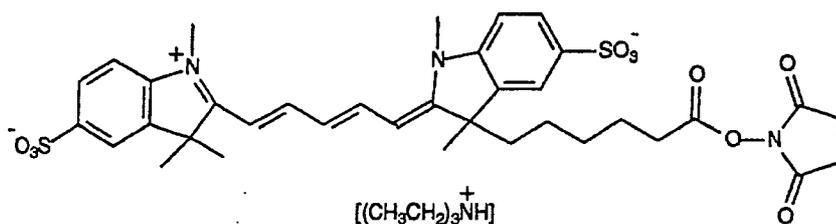
Verbindung 23

[0117] Ein Gemisch aus 0,37 g 2-(4-Anilinobutadienyl)-3,3-dimethyl-1-(3-sulfopropyl)indolium (dargestellt durch die Umsetzung von Trimethylindolin und Propansulton wie in Beispiel 3 mit anschließender Umsetzung mit Malonaldehyddianil-hydrochlorid wie in Beispiel 4), 1,35 mmol 3-(5-Carboxypentyl)-3-methyl-1-(3-sulfopropyl)indolium (dargestellt durch die Umsetzung von 7-Methyl-8-oxononansäure und Phenylhydrazin, wie in Beispiel 1), 7 ml DM F, 0,42 ml Triethylamin und 0,1 ml Essigsäureanhydrid wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Essigester (30 ml) versetzt, und der Niederschlag wird an Kieselgel unter Erhalt von 55 mg Verbindung 23 aufgereinigt.

Beispiel 24. Synthese entsprechender aktivierter Ester aus freien Säuren.

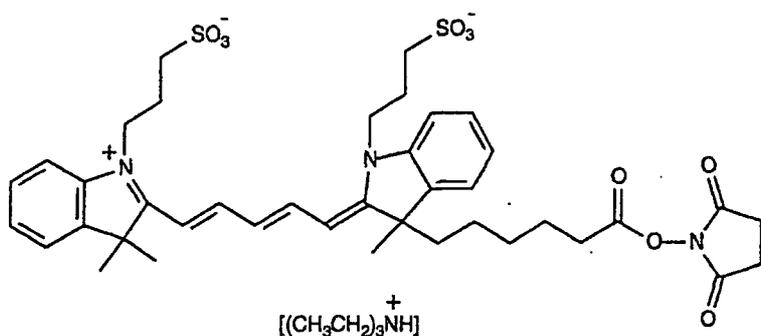
[0118] Die folgenden aktivierten Ester werden aus den entsprechenden freien Säuren gemäß dem Verfahren in Beispiel 9 dargestellt:

Verbindung 24, dargestellt aus Verbindung 15



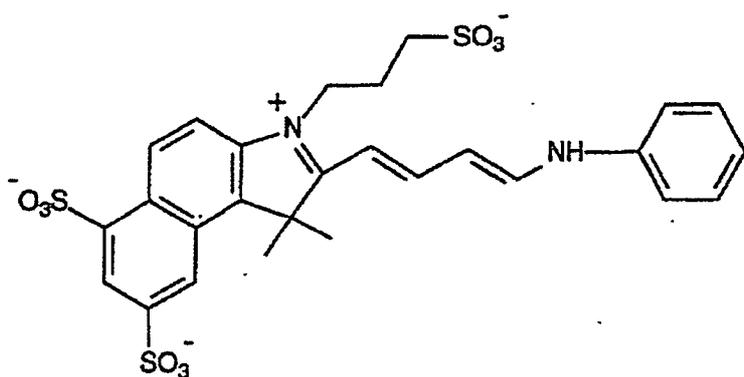
Verbindung 24

Verbindung 25, dargestellt aus Verbindung 23



Verbindung

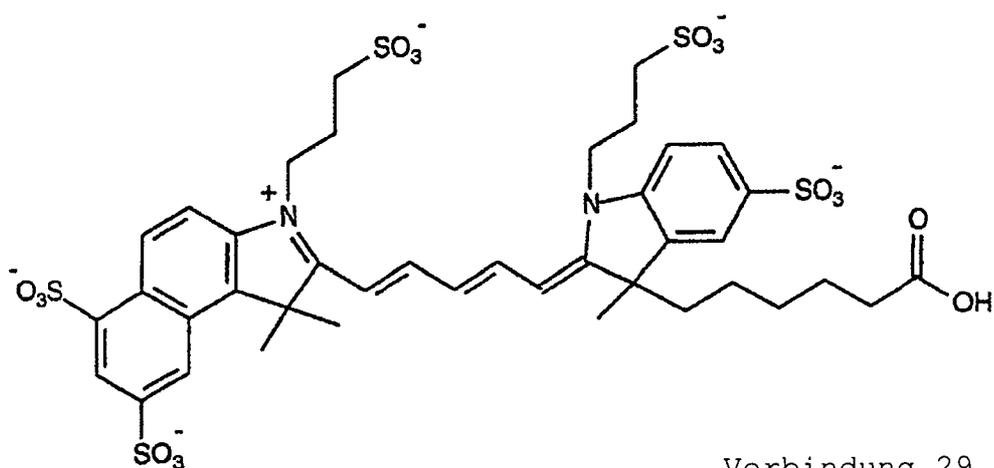
Beispiel 25. Darstellung von Verbindung 28.



Verbindung 28

[0119] Die Verbindung wird durch Quaternisierung von 1,1,2-Trimethylbenzindoleninium-1,3-disulfonat (Bio-conjugate Chem., 356–362 (1996)) mit Propansulton dargestellt und anschließend mit zwei Äquivalenten Malonaldehyddianil-hydrochlorid in Essigsäure mit einer katalytischen Menge an Triethylamin unter Erhalt von Verbindung 28 erhitzt.

Beispiel 26. Darstellung von Verbindung 29



Verbindung 29

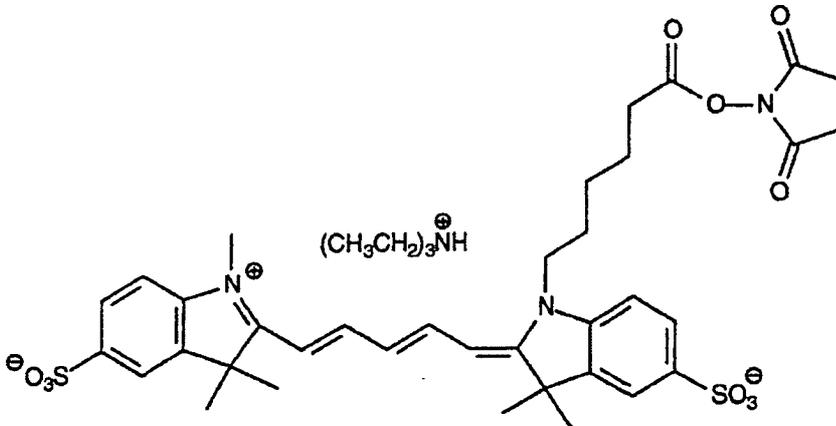
Verbindung 29

[0120] Die Verbindung wird dargestellt, indem jeweils ein Äquivalent Verbindung 28 und 3-(5-Carboxypentyl)-2,3-dimethyl-5-sulfo-1-(3-sulfopropyl)-indoleninium inneres Salz, Natriumsalz, in Gegenwart von drei Äquivalenten Triethylamin und einem Äquivalent Essigsäureanhydrid in DMF eine Stunde bei Raumtemperatur unter Erhalt von Verbindung 29 gerührt wird. Verbindung 29 wird gegebenenfalls in dessen entsprechenden Suc-

cinimidylester umgewandelt, wie in Beispielen 9 und 24 beschrieben.

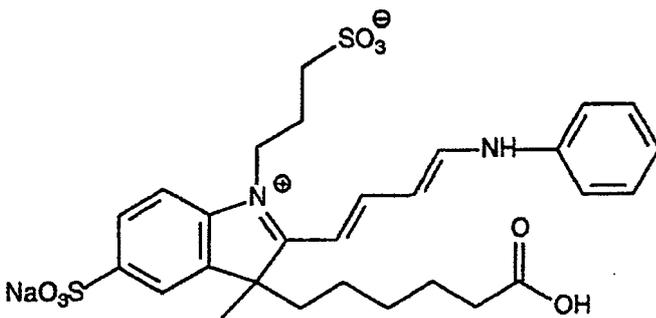
Beispiel 27. Darstellung von Verbindung 30

[0121] Zum Vergleich mit erfindungsgemäßen Farbstoffen (siehe [Fig. 1](#)) wird Verbindung 30 gemäß BIO-CONJUGATE CHEM. 4, 105–111 (1993) dargestellt.



Verbindung 30

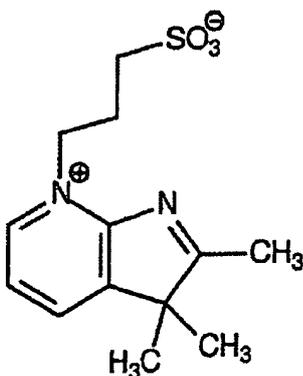
Beispiel 28. Darstellung von Verbindung 31



Verbindung 31

[0122] Ein Gemisch aus 45 mmol Verbindung 2 und 23 g Malonaldehyddianil-hydrochlorid wird am Rückfluß in 400 ml Essigsäure mit 0,65 ml Triethylamin eine Stunde erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und der Rückstand an Kieselgel unter Erhalt von 2,4 g des Produkts aufgereinigt.

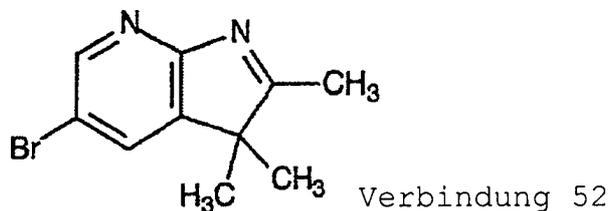
Beispiel 29. Darstellung von 7-(3-Sulfopropyl)-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridinium, inneres Salz (Verbindung 51)



Verbindung 51

[0123] Ein Gemisch aus 9 g 2,3,3-Trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridin und 20,6 g Propansulton wird drei Stunden bei 60°C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in 100 ml Acetonitril gelöst und mit 300 ml Essigester versetzt. Der erhaltene klebrige Feststoff wird wiederum in 300 ml Essigester gerührt, sodaß 22 g des Produkts erhalten werden.

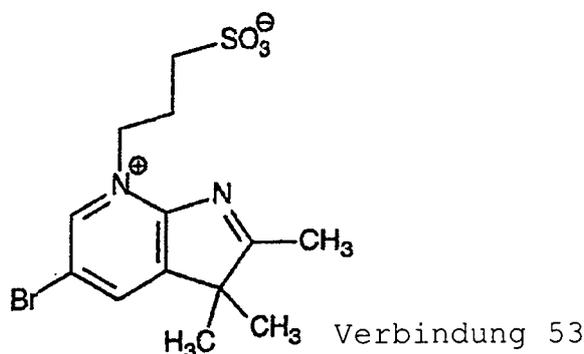
Beispiel 30. Darstellung von 5-Brom-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridin (Verbindung 52).



Verbindung 52

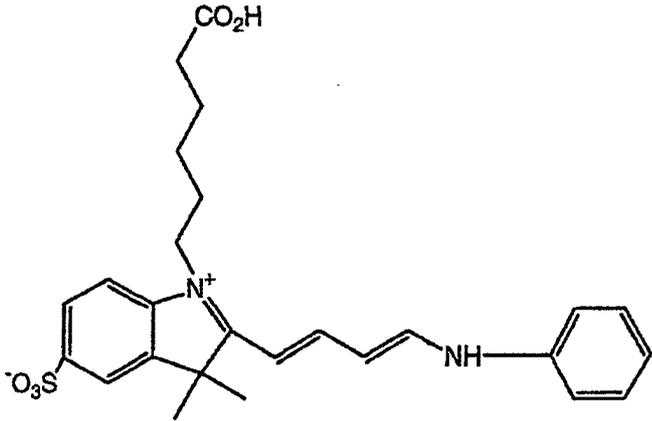
[0124] 40 g 2,5-Dibrompyridin in 200 ml 2-Methoxyethanol werden mit 53 ml wasserfreiem Hydrazin versetzt, und das Gemisch wird drei Stunden bei 110°C unter Erzeugung des 5-Brom-2-hydrazinopyridins erhitzt. Ein Gemisch aus 10 g dieses Hydrazinopyridins wird am Rückfluß über Nacht mit 11 ml 3-Methyl-2-butanon in 40 ml Benzol "equipped" am Rückfluß erhitzt, wobei ein mit einer Dean-Stark-Falle ausgestatteter Kühler verwendet wird. Alle flüchtigen Bestandteile werden unter vermindertem Druck abgetrennt und der erhaltene Rückstand in 62 g Polyphosphorsäure 45 Minuten bei 140°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird in Wasser gegossen, mit Natriumhydroxid neutralisiert und mit Essigester extrahiert. Der erhaltene Rohrückstand wird über Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt, wobei mit 1:1-Essigester/Hexan eluiert wird, sodaß man 1,44 g des Produkts erhält.

Beispiel 31. Darstellung von 5-Brom-7-(3-sulfopropyl)-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridinium, inneres Salz (Verbindung 53).

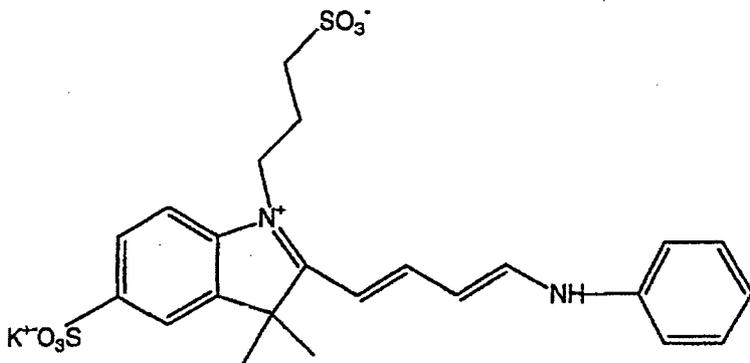


Verbindung 53

[0125] Ein Gemisch aus 1 g 5-Brom-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridin (Verbindung 52, Beispiel 30) und 1,54 g Propansulton wird 2 Stunden bei 65°C erhitzt. Es wird mit Essigester versetzt und das erhaltene Gemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur unter Erhalt von 2,26 g des Produkts gerührt.



Verbindung 54



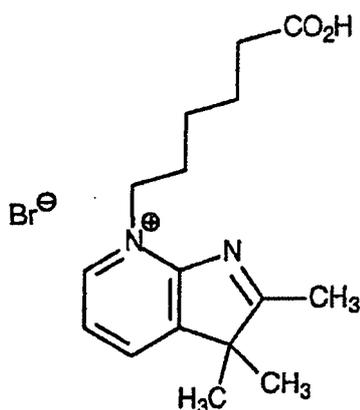
Verbindung 55

[0126] 2-(4-Anilinobutadienyl)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-5-sulfoindolinium, inneres Salz und 2-(4-Anilinobutadienyl)-1-(3-sulfopropyl)-3,3-dimethyl-5-sulfoindolinium, Kaliumsalz (Verbindung 54 bzw. 55) werden nach einem Literaturverfahren (Mujumdar, et al, BIOCONJUGATE CHEMISTRY 4, 105–111 (1993)) dargestellt.

Beispiel 33. Darstellung von Succinimidylestern von Carbonsäuren

[0127] Succinimidylesterderivate werden typischerweise aus den entsprechenden Carbonsäuren unter Verwendung des 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborats (Bannwarth et al. TETRAHEDRON LETT. 1157–1160 (1991)) sowie entweder Triethylamin oder Diisopropylethylamin dargestellt. Succinimidylesterderivate lassen sich ebenso leicht durch Kopplung eines Carbonsäurederivats an N-Hydroxysuccinimid unter Verwendung eines Aktivierungsmittels, wie z.B. eines Carbodiimids, darstellen.

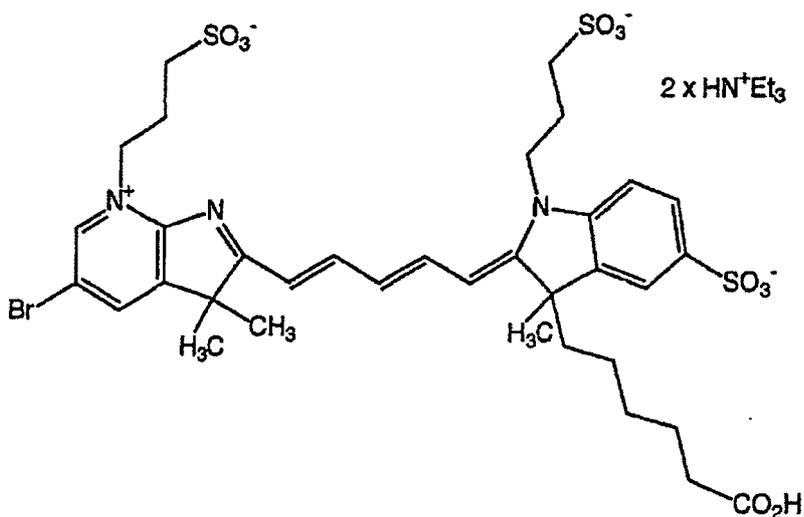
Beispiel 34. Darstellung von 7-(Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridiniumbromid (Verbindung 59).



Verbindung 59

[0128] Ein Gemisch aus 0,54 g 2,3,3-Trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridin und 1,32 g 6-Bromhexansäure wird eine Stunde bei 120°C erhitzt. Es wird mit Essigester (10 ml) versetzt, und das Reaktionsgemisch wird 15 Minuten am Rückfluß erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die überstehende Flüssigkeit wird unter Erhalt des Produkts abgegossen.

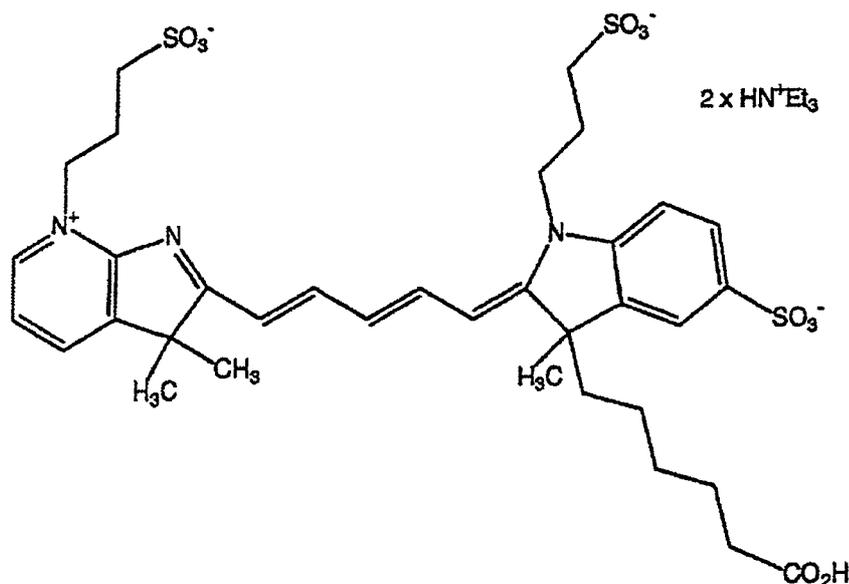
Beispiel 35. Darstellung von Verbindung 66 und Verbindung 67



Verbindung 66

[0129] Ein Gemisch aus 0,32 g 2-(4-Anilinobutadienyl)-3-carboxypentyl-3-methyl-5-sulfo-1-sulfopropylindolinium, Natriumsalz (Verbindung 31, Beispiel 28), 0,75 g 5-Brom-7-(3-sulfopropyl)-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridinium, inneres Salz (Verbindung 53, Beispiel 31), 0,36 ml Triethylamin und 0,1 ml Essigsäureanhydrid wird in 13 ml DMF 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Versetzen mit 50 ml Essigester wird der Rohfeststoff abfiltriert und mit HPLC aufgereinigt. Ein Succinimidylesterderivat (Verbindung 67) wird gemäß den im Beispiel 33 angegebenen Verfahren dargestellt.

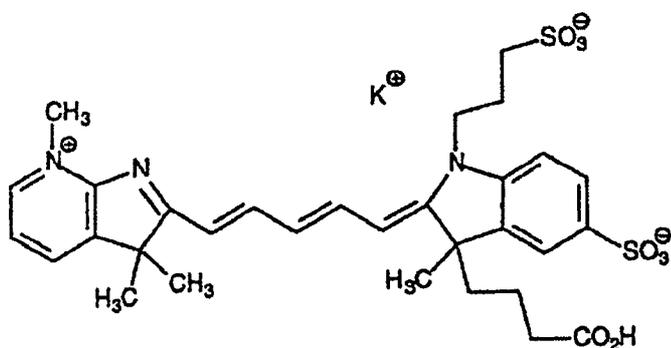
Beispiel 36. Darstellung von Verbindung 68 und Verbindung 69



Verbindung 68

[0130] Die Verbindung wird auf ähnliche Weise wie Verbindung 66 hergestellt, außer daß 7-(3-Sulfopropyl)-2,3,3-trimethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridinium, inneres Salz (Verbindung 51, Beispiel 29) verwendet wird. Das Rohprodukt wird mit HPLC aufgereinigt. Ein Succinimidylesterderivat (Verbindung 69) wird gemäß den in Beispiel 33 angegebenen Verfahren dargestellt.

Beispiel 37. Darstellung von Verbindung 72

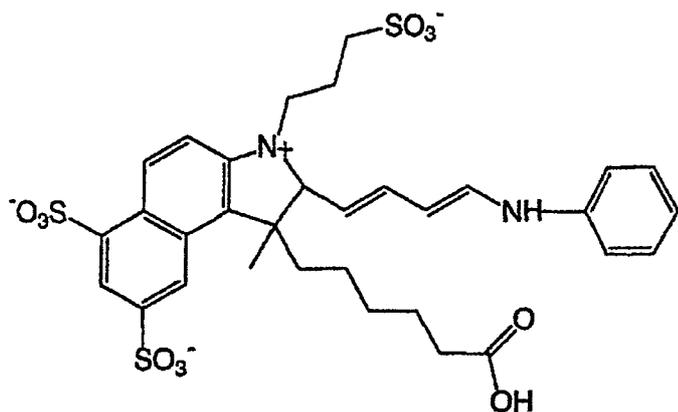


Verbindung 72

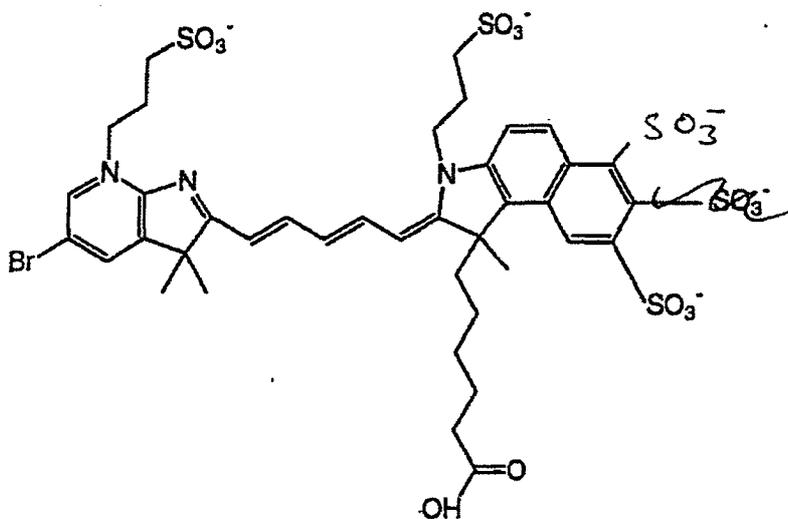
[0131] Ein Gemisch aus 150 mg 2-(Anilinobutadienyl)-3-(3-carboxypropyl)-5-sulfo-1-sulfopropylindolenium, inneres Salz, Kaliumsalz, 160 mg 2,3,3,7-Tetramethyl-3H-pyrrolo[2,3-b]pyridiniumtosylat, 2 ml DMF, 0,13 ml Triethylamin und 0,08 Essigsäureanhydrid wird 30 Minuten bei 40°C erhitzt. Flüchtige Bestandteile werden abgedampft und der Rohrückstand an einer Kieselgelsäule aufgereinigt.

Beispiel 40. Darstellung von Verbindung 82 und Verbindung 86

[0132] 6-Hydrazinonaphthalin-1,3-disulfonat (Bioconj. Chem., 356–362 (1996)) wird mit 7-Methyl-8-oxonansäure in Essigsäure unter Erzeugung des 1-Carboxypentyl-1,2-dimethyl-6,8-disulfobenzindolenin erhitzt. Das Benzindolenin wird mit Propansulton quaternisiert und mit Malonaldehyddianilhydrochlorid kettenverlängert, sodaß man das 2-(4-Anilinobutadienyl)-derivat (Verbindung 82) erhält, das dann mit Verbindung 53 (Beispiel 31) in Gegenwart von Essigsäureanhydrid und Triethylamin unter Erhalt des gewünschten Produkts umgesetzt wird.

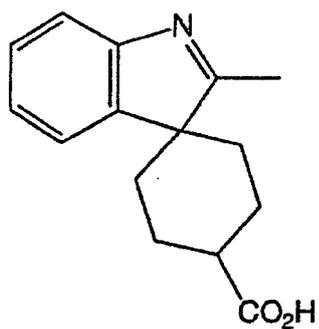


Verbindung 82



Verbindung 86

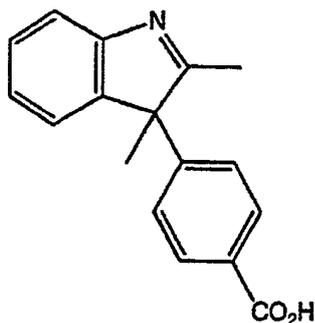
Beispiel 41. Darstellung von Verbindung 83



Verbindung 83

[0133] Ein Gemisch aus 100 mg 4-Acetylcyclohexancarbonsäure und 120 mg Hydrazinobenzolsulfonsäure wird am Rückfluß in 5 ml Essigsäure unter Gewinnung der gewünschten Verbindung erhitzt.

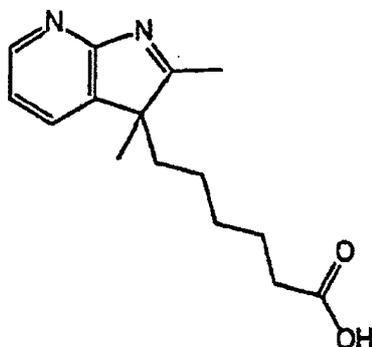
Beispiel 42. Darstellung von Verbindung 84



Verbindung 84

[0134] Ein Gemisch aus 2-(4-Carboxyphenyl)-butan-2-on und Hydrazinobenzolsulfonsäure in Essigsäure wird am Rückfluß drei Stunden unter Gewinnung des gewünschten Produkts erhitzt.

Beispiel 43. Darstellung von Verbindung 85



Verbindung 85

[0135] Ein Gemisch aus 0,85 g 2-Hydrazinopyridin und 1,6 g 7-Methyl-8-oxo-nonansäure wird am Rückfluß über Nacht in 10 ml Benzol erhitzt. Die flüchtigen Bestandteile werden angedampft und der Rückstand mit 0,2 g Zinkchlorid eine Stunde bei 250°C erhitzt sodaß das gewünschte Produkt gewonnen wird.

Beispiel 44. Darstellung von Protein-Farbstoff-Konjugaten

[0136] Eine Reihe von Farbstoffkonjugaten von Ziege-anti-Maus-IgG (GAM [= goat anti-mouse]), Ziege-anti-Kaninchen-IgG (GAR [= goat anti-rabbit]), Streptavidin, Transferrin und anderen Proteinen, einschließlich R-Phycoerythrin (R-PE) und Allophycocyanin (APC) wird mit Standardmitteln hergestellt (Hauglund et al., METH. MOL BIOL. 45, 205(1995); Hauglund, METH. MOL. BIOL. 45, 223(1995); Hauglund, METH. MOL. BIOL. 45,235 (1995); Hauglund, CURRENT PROTOCOLS IN CELL BIOLOGY 16.5.1-16.5.22 (2000)), wobei Verbindung 9 sowie ein Monosuccinimidylesterderivat des Farbstoffs Cy5 (Amersham-Pharmacia Biotech) verwendet werden.

[0137] Das typische Verfahren zur Proteinkonjugation mit erfindungsgemäßen Succinimidylestern ist wie folgt. Die Verhältnisse von Farbstoff zu Protein, Proteinkonzentration, Zeit, Temperatur, Pufferzusammensetzung und andere im Fachgebiet allgemein bekannte Variablen können so variiert werden, daß noch geeignete Konjugate erhalten werden können. Eine Lösung des Proteins wird mit ~10 mg/ml in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat hergestellt. Die Markierungsreagentien werden in einem geeigneten Lösungsmittel, wie z.B. DMF, mit ~10 mg/ml gelöst. Für vier erfindungsgemäße Farbstoffe eignet sich Wasser als Lösungsmittel. Vorbestimmte Mengen der Markierungsreagentien werden unter Rühren zu den Proteinlösungen gegeben. Ein Molverhältnis von 10 Äquivalenten Farbstoff zu 1 Äquivalent Protein ist typisch, obwohl die optimale Menge je nach dem jeweiligen Markierungsreagens, dem zu markierenden Protein sowie der Konzentration dieses Proteins variiert und empirisch bestimmt wird. Bei der Optimierung der Fluoreszenzausbeute sowie Bestimmung der Auswirkung des Substitutionsgrads (DOS) auf diese Helligkeit wird typischerweise das Verhältnis von reaktivem Farbstoff zu Protein über einen mehrfachen Bereich variiert. Das Reaktionsgemisch wird eine Stunde bei Raum-

temperatur oder mehrere Stunden auf Eis inkubiert. Das Farbstoff-Protein-Konjugat wird typischerweise von freiem nicht umgesetztem Reagenz durch Größenausschlußchromatographie, wie beispielsweise an mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS [= phosphate-buffered saline]) equilibriertem BIO-RAD P-30-Harz getrennt. Die erste, proteinhaltige gefärbte Bande wird gesammelt und der Substitutionsgrad aus der Absorption beim Absorptionsmaximum jedes Fluorphors bestimmt, wobei jeweils der Extinktionskoeffizient des freien Fluorphors verwendet wird. Das so erhaltene Farbstoff-Protein-Konjugat läßt sich in Unterfraktionen aufteilen, so daß Konjugate mit einem höheren, geringeren oder einheitlicheren DOS-Wert erhalten werden.

[0138] Eine Lösung des gewünschten Proteins wird bei 10 mg/ml in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat hergestellt. Die Markierungsreagentien werden mit 10 mg/ml in DMF gelöst. Vorbestimmte Mengen der Markierungsreagentien werden unter Rühren zu den Proteinlösungen gegeben. Ein Molverhältnis von 10 Äquivalenten Farbstoff zu 1 Äquivalent Protein ist typisch, obwohl die optimale Menge je nach dem jeweiligen Markierungsreagens, dem zu markierenden Protein sowie der Konzentration dieses Proteins variiert und empirisch bestimmt wird. Das Reaktionsgemisch wird eine Stunde bei Raumtemperatur oder mehrere Stunden auf Eis inkubiert. Das Farbstoff-Protein-Konjugat wird typischerweise von freiem nicht umgesetztem Reagenz durch Größenausschlußchromatographie, wie beispielsweise an mit PBS equilibriertem BIO-RAD P-30-Harz getrennt. Die erste, proteinhaltige gefärbte Bande wird gesammelt und der Substitutionsgrad aus der Absorption beim Absorptionsmaximum jedes Fluorphors bestimmt, wobei jeweils der Extinktionskoeffizient des freien Fluorphors verwendet wird.

Tabelle 5: Fluoreszenz von Protein-Konjugaten von Verbindung 69 (Beispiel 36)

Protein	DOS*	Quantenausbeute †
Ziege-anti-Maus-IgG	3,7	0,47
Streptavidin	4,5	0,85
Weizenkeim-Agglutinin	3,1	0,32
Ziege-anti-Kaninchen-IgG (stark kreuzabsorbiert)	4,4	0,5
Ziege-anti-Huhn-IgG	4,5	0,33
Kaninchen-anti-Maus-IgG	3,0	0,67
Ziege-anti-Maus-IgG (stark kreuzabsorbiert)	4,4	0,63
Ziege-anti-Meerschweinchen-IgG	5,1	0,33
Protein A (MR=4) ‡	2,1	0,64
Protein A (MR=8) ‡	4,9	0,39

* Extinktionskoeffizienten werden für die freie Carbonsäure in wäßriger Lösung bestimmt

† Quantenausbeute relativ zu DDRO (7-Hydroxy-9H-(1,3-dichlor-9,9-dimethylacridin-2-on) gemessen

‡ MR ist das ungefähre Molverhältnis des Farbstoffs zu Protein nach der Konjugation

Tabelle 6: Fluoreszenz von Protein-Konjugaten von Verbindung 67 (Beispiel 35)

Protein	DOS*	Quanten- ausbeute
Ziege-anti-Maus-IgG	5,9	0,15
Streptavidin	4,8	0,66
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	4,9	0,26

(stark kreuzabsorbiert)		
Ziege-anti-Huhn-IgG	-	-
Kaninchen-anti-Maus-IgG	6,0	0,31

* Extinktionskoeffizienten werden für die freie Carbonsäure in wäßriger Lösung bestimmt

[0139] Proteinkonjugate von Antikörperfragmenten, anderen Avidinen und anderen Proteinen werden auf ähnliche Weise hergestellt und analysiert.

Beispiel 45. Gesamtfluoreszenz ausgewählter Farbstoff-Protein-Konjugate in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad (DOS)

[0140] Die Konjugate von Verbindung 9 zeigen gleiche oder größere Fluoreszenz als die Konjugate des Farbstoffs Cy5 bei einem ähnlichen DOS-Wert und Konjugation an viele verschiedene Proteine (Tabelle 3). Proteinkonjugate werden mit verschiedenen DOS-Werten hergestellt (wie in Beispiel 44 beschrieben) und hinsichtlich Helligkeit (Gesamtfluoreszenz, TF [= total-fluorescence]) und relativer Quantenausbeute (RQY [= relative quantum yield]; Definition unten in Tabelle 3) verglichen. Die Gesamtfluoreszenz ist zur Gesamtfähigkeit des Biokonjugats proportional und als das Produkt aus den Werten für RQY und DOS definiert: $TF = RQY \times DOS$.

Beispiel 46. Gesamtfluoreszenz ausgewählter Farbstoff-Protein-Konjugate in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad

[0141] In Tabelle 3 ist das starke Quenchen der Fluoreszenz von Cy5-Konjugaten (selbst bei einem mäßigen DOS) gezeigt. Ein Vergleich von GAM-IgG-Verbindung 9 bei ~DOS 4,2 mit einem GAM-IgG-Cy5 bei DOS ~4,8 (siehe Tabelle 3) zeigt, daß das Verbindung 9-Biokonjugat ungefähr 5,0/0,4 (12,5) mal höher ist als das Cy5-Biokonjugat. Diese Art von Muster wird für alle Proteine in Tabelle 3 beobachtet. Im allgemeinen gilt, daß je höher der DOS-Wert, desto heller sind Verbindung 9-Biokonjugate relativ zu den Cy5-Biokonjugaten, obwohl, wie man sehen kann, die Verbindung 9-Biokonjugate bei allen getesteten DOS-Werten höher sind.

[0142] Es stellt sich heraus, daß die Abnahme des RQY-Werts der Cy5-Biokonjugate von einer Verstärkung der 600-nm-Absorptionsbande relativ zur 650-nm-Absorptionsbande begleitet wird. Dieser Effekt gilt für alle in Tabelle 3 aufgeführten Biokonjugate. Die Erhöhung der Extinktion der 600-nm-Bande ist immer mit einem starken Quenchen der Fluoreszenz assoziiert. Von Gruber et. al. (supra) wurde eine ähnliche Korrelation einer erhöhten Absorption bei 600 nm und einer starken Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet. Diese allgemeine Beobachtung wurde nun für mehrere andere Proteine bestätigt (Tabelle 3).

[0143] Die Cy5- und Verbindung 9-Derivate von GAM wurden sowohl mit Absorptionsspektroskopie als auch Fluoreszenzexcitationspektroskopie untersucht. Dabei wird bei jedem Derivat das Fluoreszenzexcitationspektrum (Emissionswellenlänge = 725 nm) jeweils auf sein Absorptionsspektrum bei 660 nm normiert. Die Cy5-GAM-Absorptionsbande bei 600 nm emittiert keine Fluoreszenz, wie anhand des großen Unterschieds zwischen der Excitation und Absorption in diesem Bereich des Spektrums zu sehen ist. Die Absorptions- und Excitationspektren von Verbindung 9-Biokonjugaten überlappen fast in diesem Bereich und zeigen somit ein drastisch verringertes Fluoreszenzquenchen. Wird dieser gleiche Cy5-GAM-Antikörper in 6,0 M Guanidiniumhydrochlorid (pH = 7,5) gelöst, so nimmt die 600-nm-Absorptionsbande stark ab, die 650-nm-Absorptionsbande verstärkt sich und die Gesamtfluoreszenzintensität steigt dramatisch an. Dieses Ergebnis deutet darauf hin,

daß die starke Abnahme der Fluoreszenz durch das Verhalten des Cy5-Derivats auf der nativen Biokonjugatstruktur verursacht wird.

[0144] Ein ähnliches Ergebnis wurde für Cy5-Derivate von mit Nuklease verdauter DNA erhalten (Beispiel 59).

Beispiel 47. Vergleich zweier "Cy5-ähnlicher" Strukturisomere (Verbindung 30 und Verbindung 24)

[0145] Zum besseren Verständnis des Ursprungs der anomalen Absorptionseffekte von Cy5-Biokonjugaten und des wesentlich kleineren Effekts mit Verbindung 9 wurden zwei Cy5-Isomere synthetisiert und an GAR mit verschiedenen DOS-Werten konjugiert (Verbindung 30 und Verbindung 24). Bei [Fig. 1](#) handelt es sich um einen direkten Vergleich der Absorptionseigenschaften dieser beiden Isomere bei DOS-Werten von ungefähr 2,8, 4,3 und 5,5 an GAR. Der einzige Unterschied zwischen den chemischen Strukturen von Verbindung 30 und 24 besteht in der Änderung der Stellung der reaktiven Gruppierung von der 1-Stellung (Cy5-Position) zur 3-Stellung (von allen erfindungsgemäßen Farbstoffen geteilt) des Indoliumrings. Dabei ist ersichtlich, daß diese chemische Änderung eine drastische Verbesserung des Verhaltens der Absorption von Verbindung 24 gegenüber Verbindung 30 verursacht hat. Ebenso stellt Verbindung 24 eine höhere Fluoreszenzemission als Verbindung 30 bei allen diesen getesteten DOS-Werten dar (Tabelle 3).

Beispiel 48. Vergleich der Gesamtfluoreszenz von GAM-Konjugaten

[0146] Konjugate des Farbstoffs Cy5 mit GRM wurden von mehreren Quellen bezogen (Tabelle 3). Absorptionsspektren von jedem dieser Konjugate bestätigen, daß alle Cy5-GAM-Konjugate bei 600 nm (relativ zur 650-nm-Bande) wesentlich größere Absorptionen als die entsprechenden Verbindung 9-GAM-Konjugate aufwiesen. Um die Fluoreszenzfähigkeiten zu vergleichen, werden die Proteine auf ungefähr die gleiche Konzentration eingestellt, wie sie über die Absorption bei 280 nm mit einer Korrektur für den Beitrag der Farbstoffabsorption bei 280 nm gemessen wird. Bei einigen kommerziellen Cy5-Biokonjugaten wurde aufgrund des Vorhandenseins von Stabilisatoren mit einer Absorption bei 280 nm die von der Lieferfirma angegebene Proteinkonzentration verwendet. Die Konjugate werden bei 633 nm angeregt und das Fluoreszenzemissionsspektrum gemessen. Die Ergebnisse in Tabelle 3 bestätigen stärkere Fluoreszenzhelligkeit (TF) von GAM-Konjugaten von Verbindung 9 im Vergleich mit den kommerziell erhältlichen Cy5-Konjugaten von GAM.

[0147] Die erhöhte Helligkeit wird auch in Experimenten deutlich, die am Durchflußcytometer durchgeführt wurden. Die Intensitätsvergleiche am Durchflußcytometer sind nicht auf die gleiche Art von RQY-, DOS- und TF-Berechnungen angewiesen, wie sie für die Fluoreszenzintensitätsvergleiche auf spektroskopischer Basis benötigt wird.

[0148] Menschliches peripheres Blut wird in ein Röhrchen mit Natriumheparin aufgezogen. 100 µl Blut werden in ein Falcon-Röhrchen gegeben. Das Blut wird 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 5 µl monoklonalen Maus-Antikörpern gegen sowohl menschliches CD16 als auch menschliches CD32 (Caltag) blockiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und auf 100 µl resuspendiert. Anschließend wird das Blut mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen Maus-anti-CD3 (Caltag) bei der empfohlenen Konzentration von 0,50 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper werden die Zellen gewaschen und resuspendiert. Das Blut wird dann mit GAM-Konjugaten von Verbindung 9 (hergestellt wie in Beispiel 44) sowie den kommerziellen GAM-Konjugaten von Cy5 von Jackson Laboratories (DOS-1, 9) und Amersham-Pharmacia (DOS-11) bei einer Konzentration von 0,50 µg und 37°C 30 Minuten inkubiert. Die roten Blutzellen werden mit einem Zellysepuffer lysiert und zur Abtrennung der lysierten roten Blutzellen zentrifugiert. Das Zellpellet wird einmal mit PBS gewaschen und auf ein Endvolumen von 500 µl resuspendiert. Die Proben werden am Durchflußcytometer FACScan (BD Biosciences) analysiert, wobei mit einem 488 nm- Argonionenlaser sowie einem Langpaßfilter (> 650 nm) angeregt wird. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität für die Verbindung 9-Konjugate von GAM, von der der Hintergrund subtrahiert wurde, beträgt 164, wohingegen die von den Firmen Jackson Laboratories und Amersham-Pharmacia hergestellten Cy5-GAM-Konjugate Werte von 71 bzw. 30 aufweisen.

[0149] Durchflußcytometrieuntersuchungen werden in Abhängigkeit von dem DOS für diesen Antikörper durchgeführt, wobei sich herausstellt, daß bei allen DOS-Werten das Konjugat von Verbindung 9 mit GAM 1,4 bis 5,9 mal heller ist als die kommerziell erhältlichen Cy5-Konjugate von GAM (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7

DOS	(Verbindung 9 GAM) / Amersham Cy5 GAM) †	(Verbindung 9 GAM) / Jackson Cy5 GAM) ‡
1,83	4,84	1,92
2,36	5,7	2,26
3,94	5,8	2,26
4,36	5,86	2,33
7,25	3,6	1,4

†, ‡ Geometrischer Mittelwert der von mit Verbindung 9 markierten GAM erhaltenen Fluoreszenzintensitäten, von denen der Hintergrund subtrahiert wurde, geteilt durch die Intensität der Amersham-Pharmacia Biotech (†) bzw. der Jackson Laboratories(‡)-Cy5-Version dieses gleichen Antikörpers.

Beispiel 49. GAR-Konjugate von Verbindung 13 sowie derartige Konjugate des spektralähnlichen Farbstoffs Cy3

[0150] GAR wird mit Verbindung 13 sowie den Cy3-reaktiven Farbstoffen mit verschiedenen Substitutionsgraden im Bereich von 1,0–12 markiert. In allen Fällen ist die Helligkeit der GAR-Konjugate von Verbindung 13 besser als die des mit Cy3-Farbstoff markierten GAR (bei äquivalentem DOS). Ein typisches Beispiel ist in [Fig. 2](#) gezeigt (DOS ~6,3). Excitationswellenlänge = 532 nm.

Beispiel 50. Photostabilitätsvergleich

[0151] "Photobleaching"-Experimente werden in kleinen Kapillarröhrchen bei einer Konzentration von jeweils 0,5 µM Verbindung 9 bzw. kommerziell erhältlichen Cy5-reaktiven Succinimidylestern in PBS, pH 7,5 durchgeführt. Dabei wird das 40X-Objektiv eines Eclipse E-400-Geräts von Nikon sowie ein Cy3/Cy5-Filter XF92 (Omega) zusammen mit der Excitation einer 100 W-Quecksilberlampe verwendet. Die integrierten Intensitäten werden unter konstanter Bestrahlung zeitabhängig gesammelt ([Fig. 3](#)). Nach 100 Minuten Bestrahlung ist Verbindung 9 immer noch etwa zweimal höher als der Farbstoff Cy5.

Beispiel 51. Markierung von β-Galactosidase mit einem Thiolreaktiven Farbstoff

[0152] Eine Lösung von β-Galactosidase, einem an freien Thiolgruppen reichen Protein, wird in PBS hergestellt (2,0 mg in 400 µl). Anschließend wird die Proteinlösung mit einer Lösung von 20 mg/ml des Maleimidderivats Verbindung 11 in DMF versetzt. Nicht umgesetzter Farbstoff wird an einer Spin-Säule abgetrennt. Der Substitutionsgrad mit dem Farbstoff wird unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten des freien Farbstoffs abgeschätzt. Die Proteinkonzentration wird aus der Absorption bei 280 nm abgeschätzt, wobei für die Absorption von Verbindung 11 bei dieser Wellenlänge korrigiert wird.

Beispiel 52. Fluoreszenzenergieübertragung in Konjugaten von R-Phycoerythrin und Allophycocyanin

[0153] Das R-Phycoerythrin (R-PE)-Konjugat von Verbindung 9 wird wie in Beispiel 44 mit einem DOS-Wert hergestellt, der ausreichend hoch ist, um die Donatorfluoreszenz fast vollständig zu quenchen. (DOS ~4-8). Das erhaltene Phycobiliproteinkonjugat wird bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenzemission mit der von bei der gleichen Wellenlänge angeregtem nichtmodifiziertem R-Phycoerythrin verglichen. Es findet eine hocheffiziente Energieübertragung (> 99%) vom Protein auf den Fluoreszenzfarbstoff statt.

[0154] Der an R-PE mit einem DOS-Wert von 4,7, 8,2 bzw. 13 konjugierte Verbindung 22 erzeugt Energieübertragungseffizienzen von ~90%, ~99% bzw. ~99,3%. Ein Konjugat dieser Komplexe mit Streptavidin wird im wesentlichen wie bei Hauglund (METH. MOL. BIOL. 45, 205 (1995), supra) hergestellt. Dieses Streptavidinkonjugat behält die Energieübertragungseigenschaften und eignet sich zur Anfärbung von Zellen in Durchflußcytometern, bei denen zur Anregung der Argonionenlaser verwendet wird.

[0155] Ebenso lassen sich Tandemkonjugate von Allophycocyanin herstellen, wobei längerwellige erfindungsgemäße Farbstoffe, wie z.B. Verbindung 22, bei einer Anregung nahe 633 nm eine Emission weit jenseits von 700 nm ergeben.

[0156] Menschliches peripheres Blut wird wie in Beispiel 48 in ein Röhrchen mit Natriumheparin aufgezogen, außer daß dabei als primärer Schritt ein biotinylierter Anti-CD3-Antikörper (Caltag) verwendet wird, wobei Tandem-Farbstoffkonjugate von Verbindung 9-derivatisiertem Streptavidin-R-PE sowie der kommerziellen Cy5-Version dieses Produkts (Gibco Red 670) zum Nachweis in Parallelexperimenten verwendet werden. Die Proben werden am Durchflußcytometer FACScan (BD Biosciences) analysiert, wobei mit einem 488 nm-Argonionenlaser und einem Langpaß (> 650 nm)-Filter angeregt wird. Das Signal-Rausch-Verhältnis des aus Verbindung 9 hergestellten Tandem-Konjugats ist ~4,5 mal heller als das entsprechende Cy5-Tandem-Konjugat.

Beispiel 53. Darstellung von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Mikrokügelchen

[0157] Gleichförmige Mikrokügelchen werden mit einem von vier Verfahren an die erfindungsgemäßen Farbstoffe konjugiert. In Verfahren A werden 1,0 µm große, mit Amin derivatisierte Polystyrolmikrokügelchen bei ~2% Feststoffgehalt in 100 mM NaHCO₃, pH 8,3 suspendiert und mit 2 mg/ml eines aminreaktiven Farbstoffs versetzt. Nach einer Stunde werden die Mikrokügelchen abzentrifugiert und mit Puffer gewaschen

[0158] Bei Verfahren B werden mit Carboxylat modifizierte Mikrokügelchen in einer Lösung eines Proteins, das an einen erfindungsgemäßen Farbstoff konjugiert ist, suspendiert. Das Protein wird passiv an die Mikrokügelchen absorbiert, und überschüssiges Protein wird durch Zentrifugation und Waschen abgetrennt. Mikropartikel mit einer Größe, die sich nicht zentrifugieren läßt, werden von überschüssigem Protein mittels Dialyse durch eine halbdurchlässige Membran mit einer Ausschlußgrenze für hohes MW oder mittels Gelfiltrationschromatographie getrennt.

[0159] Bei Verfahren C wird ein farbstoffmarkiertes Protein kovalent über seine Aminreste an die Carboxylatgruppen des Polymers unter Verwendung von Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) kovalent gekoppelt.

[0160] Bei Verfahren D werden biotinylierte Mikrokügelchen mit einem Streptavidin-, Avidin- oder Antibiotin-Konjugat eines erfindungsgemäßen Farbstoffs versetzt und die Konjugate wie bei Verfahren B isoliert.

[0161] Die größeren Partikel lassen sich auf Gleichförmigkeit der Anfärbung und Helligkeit mittels Durchflußcytometrie analysieren. Die Mikrokügelchen können für Tests ferner an Proteine, Oligonukleotide, Haptene und andere Biomoleküle unter Verwendung von im Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren gekoppelt werden.

Beispiel 54. Herstellung fluoreszierender Liposome mit erfindungsgemäßen Farbstoffen

[0162] Ausgewählte erfindungsgemäße Farbstoffe sind hinreichend wasserlöslich, um in das Innere von Liposomen mit im Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren eingebaut zu werden (J. BIOL. CHEM. 257, 13892 (1982) und PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 75, 4194 (1978)). Als Alternative werden Liposome, die erfindungsgemäße Farbstoffe mit einem lipophilen Substituenten (z.B. Alkyl mit 11–22 Kohlenstoffatomen) in ihren Membranen enthalten, hergestellt, indem man das fluoreszierende Lipid und die nichtmarkierten Lipide-Phospholipid(e), die das Liposom bilden, vor der Bildung der Liposomdispersion zusammen löst, im wesentlichen wie bei Szoka, Jr. et al. (ANN. REV. BIOPHYS. BIOENG. 9, 467 (1980)) beschrieben.

Beispiel 55. Herstellung von Nukleotid-Farbstoff-Konjugaten

[0163] 2 mg 5-(3-Aminoallyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Sigma Chemical) in 100 µl Wasser werden mit Verbindung 9 oder 69 in 100 µl DMF und 5 µl Triethylamin versetzt. Nach drei Stunden wird die Lösung eingengt und der Rückstand mit HPLC aufgereinigt. Die Produktfraktionen werden unter Erhalt des rotfluoreszierenden Nukleotidkonjugats lyophilisiert.

[0164] Als Alternative werden Fluoreszenzfarbstoffkonjugate von Desoxyuridin-5'-triphosphat aus 5-(3-Amino-1-propinyl)-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (wie bei Hobbs, Jr. et al, supra beschrieben) oder durch Behandlung eines thiolierten Nukleotids oder eines Thiophosphatnukleotids mit einem thiolreaktiven erfindungsgemäßen Farbstoff (wie z.B. des Maleimids, Verbindung 11) hergestellt.

[0165] Darüber hinaus wird 2'-(oder 3')-2-Aminoethylaminocarbonyladenosin-5'-triphosphat mit einem leicht-

ten Überschuß an Verbindung 9 umgesetzt, wobei nach der Fällung mit Ethanol das ribosemodifizierte Produkt über präparative HPLC aufgereinigt wird.

Beispiel 56. Herstellung eines Oligonukleotid-Farbstoff-Konjugats

[0166] Eine 5'-Amin-modifizierte, 18-Basen-M13-Primersequenz (~100 µg) wird in 4 µl H₂O gelöst. Dazu werden 250 µg Verbindung 9 oder 69 in 100 µl 0,1 M Natriumborat, pH 8,5, gegeben. Nach 16 Stunden werden 10 µl 5 M NaCl sowie drei Volumen kaltes Ethanol zugegeben. Das Gemisch wird auf -20°C abgekühlt, zentrifugiert, der Überstand wird abgegossen, das Pellet mit Ethanol gespült und anschließend in 100 µl H₂O gelöst. Das markierte Oligonukleotid wird über HPLC an einer 300 Å-C8-Reverse-Phase-Säule mit einem steigenden Gradienten von 0,1 M Triethylammoniumacetat (pH ~7) und Acetonitril (5-95% über 30 min) gereinigt. Die gewünschte Spitzenfraktion wird gesammelt und unter Erhalt des fluoreszierenden Oligonukleotids eingengt.

Beispiel 57. In-situ-Hybridisierung einer RNA-Sonde

[0167] Maus-Fibroblasten werden unter Verwendung von Standardverfahren fixiert und für eine mRNA-in-situ-Hybridisierung vorbereitet. Eine farbstoffmarkierte RNA-Sonde wird durch In-vitro-Transkription eines Plasmids, das das stromabwärts von einem Phage-T3-RNA-Polymerase-Promotor klonierte Actin-Strukturgen aus der Maus enthält, hergestellt. Für die Markierungsreaktionen gibt man 2 µl DNA-Matrize (1 µg DNA), jeweils 1 µl 10 mM ATP, CTP und GTP, 0,75 µl 10 mM UTP, 2,5 µl 1 mM Aminoallyl-markiertes UTP (Beispiel 55), 2 µl 10X-Transkriptionspuffer (400 mM Tris, pH 8,0, 100 mM MgCl₂, 20 mM Spermidin, 100 mM NaCl), 1 µl T3-RNA-Polymerase (40 Einheiten/µl), 1 µl 2 mg/ml BSA sowie 8,75 µl Wasser zusammen. Die Reaktionsansätze werden 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0168] Die DNA-Matrize wird durch 15 minütige Behandlung mit 20 Einheiten DNase I bei 37°C entfernt. Das RNA-Transkript wird durch Extraktion mit einem gleichen Volumen an Phenol:Chloroform, 1:1, und anschließend durch Chromatographie an SEPHADEX G50 gereinigt. Die markierte RNA wird fünf Minuten bei 50°C denaturiert, und anschließend mit Standardverfahren an Zellpräparationen hybridisiert. Die langwellige Fluoreszenz der markierten Zellen wird durch Anregung über ein für Cy5-ähnliche Farbstoffe optimiertes optisches Filter (Omega XF47) nachgewiesen. Die räumlich integrierte Fluoreszenz aus dem FISH-Zielbereich (18 separate Intensitäten) in Abhängigkeit von der Anzahl an pro Sondenbase eingebauten Farbstoffen für Konjugate von Verbindung 9 und von Cy5 zeigt, daß Konjugate von Verbindung 9 mehr als 50% heller sind als die entsprechende Cy5-Sonde (bei einem Einbau von -13 Basen pro Farbstoff).

Beispiel 58. Herstellung von DNA-Hybridisierungssonden mit Platin-Fluoreszenzfarbstoffverbindungen (ULS-Verbindungen)

[0169] Ein fluoreszierender Platinkomplex (ULS) wird aus erfindungsgemäßen Farbstoffen sowie aus Cy5-Monosuccinimidylester durch Adaptieren der im US-Patent 5,714,327 an Houthoff et al. (1998) bereitgestellten Verfahren hergestellt. Dabei wird für jede Markierungsreaktion jeweils ein Mikrozentrifugenröhrchen, das 1 µg pUC1.77-Plasmid-DNA mit einer menschlichen Chromosom-1-α-Satellit-Sonde (DNase-behandelt unter Erhalt einer Fragmentgröße zwischen 500-1000 bp) in 5 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA enthält, ~10 Minuten bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der DNA erhitzt. Die DNA wird auf Eis abgekühlt. 1 µl einer 1 mg/ml-Lösung des hergestellten ULS-Komplexes wird zugegeben und anschließend mit 5 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA auf ein Gesamtvolumen von 25 µl versetzt. Die Proben werden 15 Minuten bei 80°C inkubiert. Die Reaktionen werden auf Eis gestoppt. Die markierte DNA wird an einer Bio-Rad Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography Column gereinigt. Die markierten DNA-Produkte eignen sich für In-situ-Hybridisierungsexperimente.

[0170] Eine Reihe von Verbindung 9-ULS- und Cy5-ULS-DNA-Hybridisierungssonden wird untersucht, wobei die Anzahl an Farbstoffen pro Base von 0 pro 100 Basen bis ungefähr 8 Farbstoffen pro 100 Basen variiert. Ähnlich wie beim Verhalten der Cy5-Biokonjugate von Proteinen (Beispiel 48) und an Aminoallyl-markierter DNA (Beispiel 60) verstärkt sich die einem Fluoreszenzquenchen unterworfenen 600-nm-Absorptionsbande bei einer höheren Anzahl von Cy5-Farbstoffen pro DNA-Base (entsprechend dem höheren DOS-Wert bei den Proteinbeispielen) (offene Kreise, [Fig. 4](#)), jedoch nicht bei der Verbindung 9-ULS-markierten DNA (geschlossene Kreise, [Fig. 4](#)).

Beispiel 59. Herstellung von DNA-Hybridisierungs sonden unter Verwendung von Amin-modifizierter DNA und einem erfindungsgemäßen Amin-reaktiven Farbstoff

[0171] Eine Nick-Translation wird mit der eine menschliches Chromosom-1- α -Satellit-Sonde enthaltenden pUC1.77-Plasmid-DNA durchgeführt. Dabei wird das folgende in der angegebenen Reihenfolge in ein Mikrozentrifugenröhrchen gegeben: 23,5 μ l H₂O, 5 μ l 10X Nick-Translations-Puffer (0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 0,5mg/ml BSA, pH 7,8), 5 μ l 0,1 M DTT, 4 μ l d (GAC) TP mix (0,5 mM dATP, 0,5 mM dCTP, 0,5 mM dGTP), 1 μ l 0,5 mM dTTP, 4 μ l 0,5 mM Aminoallyl-dUTP, 1 μ l 1 μ g/ μ l Matrizen-DNA, 5 μ l DNase I (1 μ g/ml, 2000 Kunitz-Einheiten/mg), 1,5 μ l DNA-Polymerase I (10 U/ μ l). Das Röhrchen wird zwei Stunden bei 15°C inkubiert und anschließend mit H₂O auf ein Endvolumen von 100 μ l gebracht. Zur Reinigung der Amin-modifizierten DNA vom Enzym und von aminhaltigen Verbindungen wird die DNA unter Verwendung eines QIAQUICK PCR-Reinigungskits (Qiagen) mit den folgenden Modifikationen aufgereinigt: der Waschpuffer wird gegen 75% EtOH ausgetauscht, der Elutionspuffer wird gegen H₂O ausgetauscht und die Elution wird zweimal für jeweils fünf Minuten durchgeführt. Die DNA wird durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100% EtOH gefällt, 30 Minuten bei -70°C inkubiert, 15 Minuten zentrifugiert und mit 70% EtOH gewaschen.

[0172] Die Amin-modifizierte DNA wird in 5 μ l H₂O resuspendiert. Die Lösung wird mit 3 μ l 25 mg/ml Natriumhydrogencarbonat sowie 50 μ g Verbindung 9 oder 69 in 5 μ l DMF versetzt. Der Reaktionsansatz wird eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, anschließend mit 90 μ l H₂O versetzt und unter Verwendung eines QIAQUICK PCR-Reinigungskits (QIAGEN) mit den folgenden Modifikationen gereinigt: drei Waschschritte werden mit 75% EtOH sowie drei Elutionen von jeweils fünf Minuten mit dem QIAGEN-Elutionspuffer durchgeführt. Die DNA wird wie zuvor gefällt. Die markierten DNA-Produkte eignen sich für In-situ-Hybridisierungsexperimente, zur Verwendung auf Mikroarrays und als Fluoreszenzdonatoren oder -akzeptoren in Tests auf Hybridisierungsbasis. Ein Vergleich der Variation der Verhältnisse von Amino-Allyl-dUTP zu -dTTP mit anschließender Konjugation der cDNA mit entweder Verbindung 9 oder Cy5 ist in der Tabelle 8 gezeigt. Bei Vorhandensein eines Überschusses an reaktivem Farbstoff können sowohl Verbindung 9- als auch Cy5-Derivate cDNA in äquivalentem Ausmaß markieren.

Tabelle 8

Nukleotidverhältnis AA-dUTP:dTTB	Verbindung 9	Cy5
	Basen/Farbstoff	Basen/Farbstoff
90 μ M:10 μ M	13,2	13,6
60 μ M:10 μ M	14,8	16,1
30 μ M:10 μ M	17,6	15
10 μ M:10 μ M	18,1	18,9
3 μ M:10 μ M	23,3	23,7
1 μ M:10 μ M	30,2	32,2

Beispiel 60. Vergleich der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Nukleinsäuren

[0173] Nukleinsäurekonjugate von Verbindung 9 und von Cy5-Monosuccinimidylestern werden von der gleichen Charge von Amin-substituierter Nukleinsäure hergestellt (Beispiel 59). Unter Verwendung der obigen Vorschrift läßt sich ein Farbstoff-Markierungsverhältnis so auswählen, daß es im wesentlichen für sowohl das Cy5-Derivat als auch das Verbindung-9-Derivat identisch ist (z.B. ein Farbstoff pro 23 bis 24 Basen, Tabelle 5). Absorptionsspektren bei der gleichen Nukleinsäurekonzentration und dem gleichen Farbstoff-Markierungsverhältnis zeigen eine Verschiebung der Extinktion von der langwelligen 650-nm-Bande zu einer nichtemittierenden 600-nm-Bande für das Cy5-Konjugat relativ zu dem Konjugat von Verbindung 9 (Fig. 5). Dieses Ergebnis ist den bei Cy5-Konjugaten von Proteinen beobachteten Absorptionsänderungen sehr ähnlich. Bei 600 nm angeregte Fluoreszenzemissionsspektren zeigen eine viermal größere Fluoreszenz des Konjugats von Verbindung 9-cDNA gegenüber dem Cy5-cDNA-Konjugat (Fig. 5).

[0174] Die synthetisierte Cy5-markierte cDNA wird mit Mikrokokken-Nuklease (EC 3.1.31.1; Worthington Biochemicals) verdaut. Das Enzym wird dabei mit 1,0 mg/ml in Wasser in Reagentienqualität gelöst und auf un-

gefähr 0,001 mg/ml in 0,1% Rinderserumalbumin vor der Zugabe zu den mit Cy5-Farbstoff und Verbindung 9-markierten cDNAs, pH = 8,8, 0,1 M Natriumborat, 0,01 M Calciumchlorid, verdünnt. Man läßt die Reaktion vier Stunden bei Raumtemperatur ablaufen.

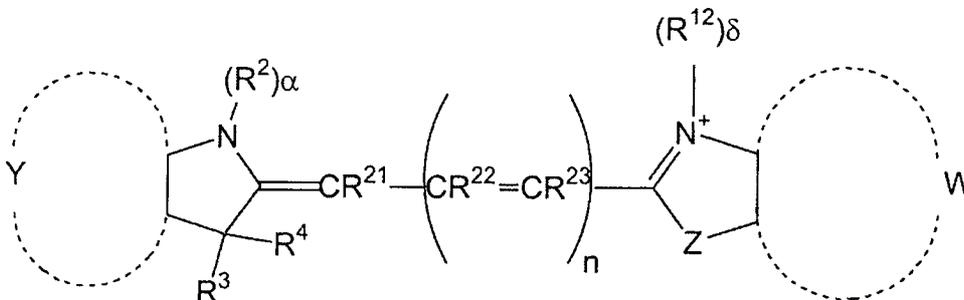
[0175] Ein Vergleich der Absorptionsspektren der identisch markierten cDNA vor und nach der Behandlung mit der Nuklease (die die cDNA zu dNMPs verdaut) zeigt, daß sich die Verzerrung in der Absorption des Cy5-cDNA-Konjugats eliminieren läßt, indem die cDNA bis zu ihren einzelnen Desoxynukleosidmonophosphaten verdaut wird. Gleichzeitig steigt die Fluoreszenz der Cy5-cDNA nach dem Verdau auf das ~15-fache an, was zeigt, daß diese Änderung des Absorptionsmusters mit der starken Abnahme der mit dem Cy5-cDNA-Konjugat assoziierten Fluoreszenz assoziiert ist.

Beispiel 61. Unterscheidung von lebenden und toten Zellen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Farbstoffe

[0176] Ausgewählte erfindungsgemäße Farbstoffe sind hochpolar und daher relativ unfähig, die Membranen von lebenden Zellen zu durchdringen. Diese Farbstoffe lassen sich daher zur Unterscheidung von Zellen mit intakten gegenüber solchen mit geschädigten Zellmembranen in einem Ein-Farben-Test wie folgt einsetzen: Monocyten-Macrophagen, mit Abelson Leukemia Virus transformierte (RAW264.7) Zellen der Maus werden trypsinisiert und mit PBS, pH 7,2 gewaschen. Ungefähr 8–10 Millionen, in 180 µl PBS, pH 7,2 suspendierte Zellen werden in ein Glasteströhrchen gegeben und bei 50°C 20 Minuten in einem Wasserbad erwärmt, um einen Teil der Zellen abzutöten. Ungefähr 60 µl (2–3 Millionen Zellen) der Zellsuspension werden zu 940 µl PBS, pH 7,2 gegeben und anschließend mit 0,1 µl einer 1 mg/ml-Lösung eines Succinimidylesterderivats eines erfindungsgemäßen Farbstoffs in DMSO versetzt. Das Gemisch wird 30 Minuten auf Eis inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen, wonach 200 µl PBS, pH 7,2 zugegeben werden. Eine identische Portion der Zellen wird mit 2 µl einer 150 µM Lösung von Propidiumiodid in Wasser versetzt (als Kontrolle für tote Zellen). Die Analyse der Zellsuspension mittels Durchflußcytometrie zeigt, daß mit den vorliegenden Verbindungen angefarbte Populationen toter Zellen und solche, die mit Propidiumiodid angefarbt sind, sich sehr ähnlich sind.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel:



und ihre Salze, wobei

R^3 für $-L-R_x$ oder für $-L-S_c$ und R^4 unabhängig für $-L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für ein C_1-C_{22} -Alkyl oder C_7-C_{22} -Arylalkyl, in dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome, ausgewählt aus N, O und S, eingebaut sind und dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C_1-C_6 -Alkoxy, C_1-C_6 -Alkylamino oder C_2-C_{12} -Dialkylamino oder C_3-C_{18} -Trialkylammonium substituiert ist, steht oder R^3 und R^4 zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, mit $L-R_x$ oder mit $-L-S_c$ substituierten Ring vervollständigenden und

L für eine einzelne kovalente Bindung oder eine lineare oder verzweigte, zyklische oder heterozyklische, gesättigte oder ungesättigte kovalente Verknüpfung mit 1–20 Nichtwasserstoffatomen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus C, N, P, O und S, sodaß die Verknüpfung eine beliebige Kombination aus Ether-, Thioether-, Amin-, Ester-, Amidbindungen oder aus Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfach-, -Doppel- oder -Dreifachbindungen oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder aus Phosphor-Sauerstoff-, Phosphor-Schwefel-, Stickstoff-Stickstoff-, Stickstoff-Sauerstoff- oder Stickstoff-Platin-Bindungen oder aus aromatischen oder heteroaromatischen Bindungen enthält, steht,

R_x für eine reaktive Gruppe steht,

S_c für eine konjugierte Substanz steht,

Y die zur Bildung von einem bis zwei kondensierten aromatischen Ringen mit jeweils 6 Atomen in jedem Ring

notwendigen Atome darstellt, wobei die Y Atome ausgewählt sind aus -CH, -C, -CR¹ und -N(R²)_β, worin β jeweils gleich 0 oder 1 ist und R¹ jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, C₂-C₁₂-Dialkylamino, wobei deren Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert ist, steht,

R², wenn vorhanden (bei α oder β gleich 1), jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für ein C₁-C₂₂-Alkyl oder C₇-C₂₂-Arylkyl, in dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome, ausgewählt aus N, O und S, eingebaut sind und dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, C₂-C₁₂-Dialkylamino oder C₃-C₁₈-Trialkylammonium substituiert ist, steht, α gleich 0 oder 1 ist und α + gesamtes β = 1, und

W die zur Bildung von einem bis zwei kondensierten aromatischen Ringen mit jeweils 6 Atomen in jedem Ring notwendigen Atome darstellt, wobei die W Atome ausgewählt sind aus -CH, -C, -CR^{1'} und -N(R¹²)_{β'}, worin β' jeweils gleich 0 oder 1 ist und R^{1'} jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, C₂-C₁₂-Dialkylamino, wobei deren Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert ist, steht,

R¹² jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für ein C₁-C₂₂-Alkyl oder C₇-C₂₂-Arylkyl, in dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome, ausgewählt aus N, O und S, eingebaut sind und dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino, C₂-C₁₂-Dialkylamino oder C₃-C₁₈-Trialkylammonium substituiert ist, steht, δ gleich 0 oder 1 ist und δ + gesamtes β' = 1, Z für O, S oder CR¹³R¹⁴ steht,

R¹³ und R¹⁴ unabhängig für -L-R_x oder für -L-S_c oder für ein C₁-C₂₂-Alkyl oder C₇-C₂₂-Arylkyl, in dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome, ausgewählt aus N, O und S, eingebaut sind und dessen Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C₁-C₆-Alkoxy, C₁-C₆-Alkylamino oder C₂-C₁₂-Dialkylamino oder C₃-C₁₈-Trialkylammonium substituiert ist, stehen oder R¹³ und R¹⁴ zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, gegebenenfalls mit L-R_x oder mit -L-S_c substituierten Ring vervollständigend,

n gleich 1, 2 oder 3 ist und

R²¹, R²² und R²³ jeweils unabhängig für H, F, Cl, C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₆-Alkoxy, Aryloxy, einen Stickstoffheterozyklus, ein Iminiumion, L-R_x oder -L-S_c stehen, oder zwei beliebige benachbarte Substituenten von R²¹, R²² und R²³, wenn zusammengenommen, einen 4-, 5- oder 6-gliedrigen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffring, der gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit C₁-C₆-Alkyl, Halogen oder einem Carbonylsauerstoff substituiert ist, bilden oder R²¹ zusammengenommen mit R⁴ einen gegebenenfalls mit C₁-C₆-Alkyl substituierten 6-gliedrigen Ring bildet oder R²³, welcher neben Z liegt, zusammengenommen mit einem der Reste R¹³ und R¹⁴ einen gegebenenfalls mit C₁-C₆-Alkyl substituierten 6-gliedrigen Ring bildet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die Atome für Y ausgewählt sind aus -CH, -C und -CR¹, α gleich 1 ist,

R² und R¹² jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für ein C₁-C₂₂-Alkyl, in das gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome eingebaut sind und das gegebenenfalls substituiert ist, stehen, δ gleich 0 oder 1 ist und δ + gesamtes β' = 1 und δ nur dann gleich 1 ist, wenn W keine Ringstickstoffatome enthält.

3. Verbindung nach Anspruch 2, wobei die Atome für W ausgewählt sind aus -CH, -C, -CR^{1'} und -N(R¹²)_{β'}, wobei β' gleich 1 ist, aber höchstens eines der Atome in W -N(R¹²)_{β'} ist, δ gleich 0 ist und Z für CR¹³R¹⁴ steht.

4. Verbindung nach Anspruch 2, wobei die Atome für W ausgewählt sind aus -CH, -C und -CR^{1'}, δ gleich 1 ist und Z für CR¹³R¹⁴ steht.

5. Verbindung nach Anspruch 2, wobei

R⁴ unabhängig für ein C₁-C₆-Alkyl, das gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, oder Amino substituiert ist, steht,

die Atome für Y ausgewählt sind aus -CH, -C und -CR¹, worin R¹ jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C₁-C₆-Alkyl, das gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert ist, steht,

die Atome für W ausgewählt sind aus -CH, -C, -CR^{1'} und -N(R¹²)_{β'}, wobei β' jeweils gleich 0 oder 1 ist, aber höchstens eines solcher Atome -N(R¹²)_{β'} ist und R^{1'} jeweils unabhängig für L-R_x oder für -L-S_c oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C₁-C₆-Alkyl, das gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert ist, steht,

R^2 und R^{12} unabhängig für $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für ein C_1-C_6 -Alkyl, das gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, oder Amino substituiert ist, stehen, einer der Reste R^{13} und R^{14} für ein C_1-C_6 -Alkyl und der andere der Reste R^{13} und R^{14} für $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für ein C_1-C_{22} -Alkyl, das gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C_1-C_6 -Alkoxy, C_1-C_6 -Alkylamino oder C_2-C_{12} -Dialkylamino substituiert ist, steht, R^{21} , R^{22} und R^{23} jeweils für H stehen, oder zwei beliebige benachbarte Substituenten von R^{21} , R^{22} und R^{23} , wenn zusammengenommen, einen 4-, 5- oder 6-gliedrigen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffring, der gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit C_1-C_6 -Alkyl, Halogen oder einem Carbonylsauerstoff substituiert ist, bilden.

6. Verbindung nach Anspruch 1, wobei

R^3 für $-L-R_x$ und R^4 unabhängig für ein C_1-C_{22} -Alkyl, in das gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome eingebaut sind und das gegebenenfalls substituiert ist, steht oder R^3 und R^4 zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, mit $L-R_x$ substituierten Ring vervollständigen und R_x jeweils für eine reaktive Gruppe steht, bei der es sich unabhängig um ein Acrylamid, einen aktivierten Ester einer Carbonsäure, ein Acylazid, ein Acylnitril, einen Aldehyd, ein Alkylhalogenid, ein Anhydrid, ein Anilin, ein Arylhalogenid, ein Azid, ein Aziridin, ein Boronat, eine Carbonsäure, ein Diazoalkan, ein Halogenacetamid, ein Halogentriazin, ein Hydrazin (einschließlich Hydrazide), einen Imidoester, ein Isocyanat, ein Isothiocyanat, ein Maleinimid, ein Phosphoramidit, einen reaktiven Platinkomplex, ein Sulfonylhalogenid, eine Thiolgruppe oder eine photoaktivierbare Gruppe handelt, höchstens eines der Atome in $Y-N(R^2)_\beta$ ist und S_c jeweils für eine konjugierte Substanz, bei der es sich um eine Aminosäure, ein Peptid, Polypeptid, Protein, Nukleotid, Oligonukleotid, Nukleinsäurepolymer, einen Zucker, ein Polysaccharid, Oligosaccharid, einen Fluoreszenzfarbstoff oder ein Mikrokügelchen handelt, steht, α nur dann gleich 1 ist, wenn Ψ keine Ringstickstoffatome enthält, höchstens eines der Atome in $W-N(R^{12})_\beta$ ist, R^2 und R^{12} unabhängig für $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für ein C_1-C_{22} -Alkyl stehen, δ nur dann gleich 1 ist, wenn Ω keine Ringstickstoffatome enthält, Z für $CR^{13}R^{14}$ steht, R^{13} und R^{14} unabhängig für $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für ein C_1-C_{22} -Alkyl stehen oder R^{13} und R^{14} zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, gegebenenfalls mit $L-R_x$ oder mit $-L-S_c$ substituierten Ring vervollständigen und R^{21} , R^{22} und R^{23} unabhängig für H, F, Cl, C_1-C_6 -Alkyl, C_1-C_6 -Alkoxy, Aryloxy, einen Stickstoffheterozyklus, ein Iminiumion, $L-R_x$ oder $-L-S_c$ stehen.

7. Verbindung nach Anspruch 1, wobei

R^3 für $-L-S_c$ und R^4 unabhängig für ein C_1-C_{22} -Alkyl, in das gegebenenfalls bis zu sechs Heteroatome eingebaut sind und das gegebenenfalls substituiert ist, steht oder R^3 und R^4 zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, mit $-L-S_c$ substituierten Ring vervollständigen und S_c für eine konjugierte Substanz steht, bei der es sich um einen Antikörper oder ein Fragment davon, eine Aminosäure, ein Protein, ein Peptid, ein Avidin oder Streptavidin, ein Biotin, ein Blutkomponentenprotein, eine ionenkomplexierende Gruppierung, ein Dextran, ein Enzym, einen Enzyminhibitor, ein Hormon, ein IgG bindendes Protein, ein Fluoreszenzprotein, einen Wachstumsfaktor, ein Lectin, ein Lipopolysaccharid, ein metallbindendes Protein, einen Mikroorganismus oder Teil davon, ein Neuropeptid, ein nichtbiologisches Mikropartikel, ein Nukleotid, ein Oligonukleotid, ein Peptidtoxin, ein phospholipidbindendes Protein, einen niedermolekularen Arzneistoff, ein Strukturprotein oder ein Tyramid handelt, höchstens eines der Atome in $Y-N(R^2)_\beta$ ist und $-R_x$ für eine reaktive Gruppe, bei der es sich um einen aktivierten Ester einer Carbonsäure, ein Amin, eine Carbonsäure, ein Halogentriazin, ein Hydrazid, ein Maleinimid, einen reaktiven Platinkomplex handelt, steht und α nur dann gleich 1 ist, wenn Ψ keine Ringstickstoffatome enthält, höchstens eines der Atome in $W-N(R^{12})_\beta$ ist, R^2 und R^{12} unabhängig für $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ stehen oder für ein C_1-C_{22} -Alkyl stehen, δ nur dann gleich 1 ist, wenn Ω keine Ringstickstoffatome enthält, Z für $CR^{13}R^{14}$ steht, R^{13} und R^{14} unabhängig für $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für ein C_1-C_{22} -Alkyl stehen oder R^{13} und R^{14} zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, gegebenenfalls mit $L-R_x$ oder mit $-L-S_c$ substituierten Ring vervollständigen, und R^{21} , R^{22} und R^{23} unabhängig für H, F, Cl, C_1-C_6 -Alkyl, C_1-C_6 -Alkoxy, Aryloxy, einen Stickstoffheterozyklus, ein Iminiumion, $L-R_x$ oder $-L-S_c$ stehen.

8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1–7, wobei L für eine einzelne kovalente Bindung oder eine lineare oder verzweigte, zyklische oder heterozyklische, gesättigte oder ungesättigte kovalente Verknüpfung mit 1–16 Nichtwasserstoffatomen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus C, N, P, O und S, in der eine Formel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus $-(\text{CH}_2)_d(\text{CONH}(\text{CH}_2)_e)_z'$, $-(\text{CH}_2)_d(\text{CON}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_e)_z'$, $-(\text{CH}_2)_d(\text{CONH}(\text{CH}_2)_e\text{NH}_2)_z'$, und $-(\text{CH}_2)_d(\text{CONH}(\text{CH}_2)_e\text{NHCO})_z'$ worin d gleich 0–5, e gleich 1–5 und z' gleich 0 oder 1 ist, eingebaut ist.

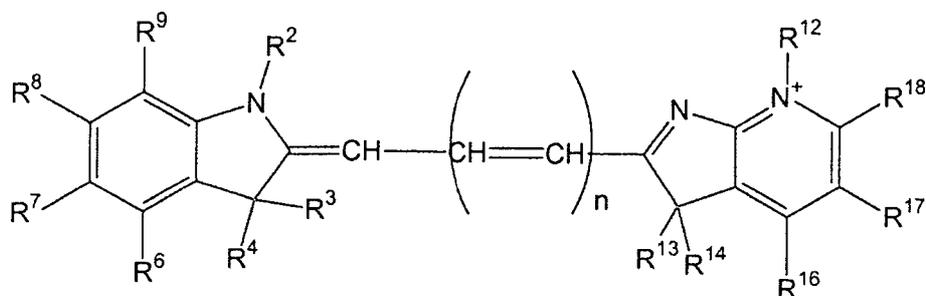
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1–8, wobei R^{21} , R^{22} und R^{23} für H stehen.

10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1–9, wobei S_c für eine konjugierte Substanz steht, bei der es sich um einen Antikörper oder ein Fragment davon, ein Avidin oder Streptavidin, ein Biotin, ein Dextran, ein Enzym, ein Fluoreszenzprotein, ein Lectin, ein Lipopolysaccharid, einen Mikroorganismus, ein nichtbiologisches Mikropartikel, ein Nukleotid, ein Oligonukleotid, ein Peptidtoxin, ein Protein A oder G, einen niedrigmolekularen Arzneistoff oder ein Tyramid handelt.

11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1–10, wobei die Atome für Y ausgewählt sind aus $-\text{CH}$, $-\text{C}$ und $-\text{CR}^1$, worin R^1 für Sulfo steht, wobei R^2 und R^{12} unabhängig für ein C_1 - C_6 -Alkyl oder ein mit Sulfo substituiertes C_1 - C_6 -Alkyl stehen und R^{13} und R^{14} unabhängig für C_1 - C_6 -Alkyl stehen.

12. Verbindung nach einem der Ansprüche 1–11, wobei $\text{R}^{1'}$ jeweils für Sulfo oder Br steht.

13. Verbindung nach Anspruch 1 der Formel:



und ihre Salze, wobei

R^3 für $-\text{L-R}_x$ oder für $-\text{L-S}_c$ steht und R^4 für ein C_1 - C_{22} -Alkyl steht und gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino oder C_2 - C_{12} -Dialkylamino oder C_3 - C_{18} -Trialkylammonium substituiert ist oder R^3 und R^4 zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, mit $-\text{L-R}_x$ oder mit $-\text{L-S}_c$ substituierten Ring vervollständigen und

L für eine einzelne kovalente Bindung oder eine lineare oder verzweigte, zyklische oder heterozyklische, gesättigte oder ungesättigte kovalente Verknüpfung mit 1–20 Nichtwasserstoffatomen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus C, N, P, O und S, sodaß die Verknüpfung eine beliebige Kombination aus Ether-, Thioether-, Amin-, Ester-, Amidbindungen oder aus Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfach-, -Doppel- oder -Dreifachbindungen oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder aus Phosphor-Sauerstoff-, Phosphor-Schwefel-, Stickstoff-Stickstoff-, Stickstoff-Sauerstoff- oder Stickstoff-Platin-Bindungen oder aus aromatischen oder heteroaromatischen Bindungen enthält, steht,

R_x für eine reaktive Gruppe steht,

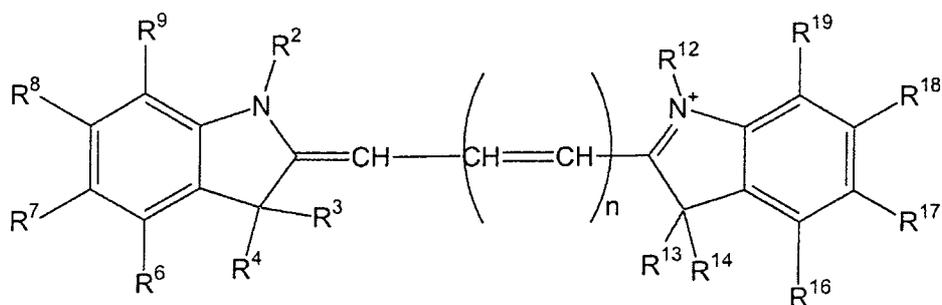
S_c für eine konjugierte Substanz steht,

R^6 bis R^9 sowie R^{16} bis R^{18} unabhängig für $-\text{L-R}_x$ oder für $-\text{L-S}_c$ oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, die jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind, stehen oder zwei beliebige benachbarte Substituenten von R^6 bis R^9 oder R^{16} bis R^{18} einen kondensierten Benzoring, der gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit $-\text{L-R}_x$ oder mit $-\text{L-S}_c$ oder mit Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, deren Alkylanteil jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert ist, substituiert ist, bilden, R^2 und R^{12} unabhängig für ein C_1 - C_6 -Alkyl oder ein mit Sulfo substituiertes C_1 - C_6 -Alkyl stehen,

R^{13} und R^{14} unabhängig für ein C_1 - C_6 -Alkyl stehen,

n gleich 1, 2 oder 3 ist.

14. Verbindung nach Anspruch 1 der Formel:



und ihre Salze, wobei

R^3 für $-L-R_x$ oder für $-L-S_c$ steht und R^4 für ein C_1 - C_{22} -Alkyl steht und gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit F, Cl, Br, I, Hydroxy, Carboxy, Sulfo, Phosphat, Amino, Sulfat, Phosphonat, Cyano, Nitro, Azido, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino oder C_2 - C_{12} -Dialkylamino oder C_3 - C_{18} -Trialkylammonium substituiert ist oder R^3 und R^4 zusammengenommen einen fünf- oder sechsgliedrigen gesättigten oder ungesättigten, mit $L-R_x$ oder mit $-L-S_c$ substituierten Ring vervollständigenden und

L für eine einzelne kovalente Bindung oder eine lineare oder verzweigte, zyklische oder heterozyklische, gesättigte oder ungesättigte kovalente Verknüpfung mit 1–20 Nichtwasserstoffatomen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus C, N, P, O und S, sodaß die Verknüpfung eine beliebige Kombination aus Ether-, Thioether-, Amin-, Ester-, Amidbindungen oder aus Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfach-, -Doppel- oder -Dreifachbindungen oder aromatischen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen oder aus Phosphor-Sauerstoff-, Phosphor-Schwefel-, Stickstoff-Stickstoff-, Stickstoff-Sauerstoff- oder Stickstoff-Platin-Bindungen oder aus aromatischen oder heteroaromatischen Bindungen enthält, steht,

R_x für eine reaktive Gruppe steht,

S_c für eine konjugierte Substanz steht,

R^6 bis R^9 sowie R^{16} bis R^{19} unabhängig für H, $L-R_x$ oder für $-L-S_c$ oder für Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, die jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind, stehen oder zwei beliebige benachbarte Substituenten von R^6 bis R^9 und R^{16} bis R^{19} einen kondensierten Benzoring, der gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit $L-R_x$ oder mit $-L-S_c$ oder mit Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, deren Alkyanteil jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert ist, substituiert ist, bilden,

R^2 und R^{12} unabhängig für ein C_1 - C_6 -Alkyl oder ein mit Sulfo substituiertes C_1 - C_6 -Alkyl stehen,

R^{13} und R^{14} unabhängig für ein C_1 - C_6 -Alkyl stehen,

n gleich 1, 2 oder 3 ist.

15. Verbindung nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, wobei R^4 für ein C_1 - C_6 -Alkyl steht.

16. Verbindung nach einem der Ansprüche 13–15, wobei R^3 für $L-R_x$ steht, wobei es sich um einen aktivierten Ester einer Carbonsäure, ein Amin, eine Carbonsäure, ein Halogentriazin, ein Hydrazid, ein Maleinimid oder einen reaktiven Platinkomplex handelt.

17. Verbindung nach Anspruch 16, wobei $-R_x$ für eine Carbonsäure oder einen Succinimidylester einer Carbonsäure oder ein Maleinimid steht.

18. Verbindung nach einem der Ansprüche 13–15, wobei R^3 $L-S_c$ ist und S_c für eine konjugierte Substanz steht, bei der es sich um einen Antikörper oder ein Fragment davon, ein Fluoreszenzprotein, ein Lectin, ein Oligonukleotid, einen niedrigmolekularen Arzneistoff oder ein Tyramid handelt.

19. Verbindung nach Anspruch 14, wobei

R^4 , R^{13} und R^{14} für Methyl stehen,

L für eine kovalente Verknüpfung steht,

R_x für eine Carbonsäure, einen Succinimidylester einer Carbonsäure, Hydrazid oder ein Maleinimid steht,

s_c für einen Antikörper oder ein Fragment davon, ein Fluoreszenzprotein, ein Lectin, ein Nukleotid, ein Oligonukleotid, ein Peptid, ein Protein, einen niedrigmolekularen Arzneistoff oder ein Tyramid steht,

R^2 und R^{12} unabhängig für Methyl oder Sulfopropyl stehen und

R^7 und R^{17} für Sulfo und R^6 , R^8 , R^9 , R^{16} , R^{18} und R^{19} für H stehen.

20. Verbindung nach Anspruch 13, wobei

R^4 , R^{13} und R^{14} für Methyl stehen,

L für eine kovalente Verknüpfung steht,

R_x für eine Carbonsäure, einen Succinimidylester einer Carbonsäure, Hydrazid oder ein Maleinimid steht,

S_c für einen Antikörper oder ein Fragment davon, ein Fluoreszenzprotein, ein Lectin, ein Nukleotid, ein Oligonukleotid, ein Peptid, ein Protein, einen niedrigmolekularen Arzneistoff oder ein Tyramid steht, R^6 , R^8 , R^9 , R^{16} und R^{18} für H stehen und (i) R^7 für Sulfo steht, R^{17} für Sulfo, Br oder H steht oder (ii) R^7 und R^6 einen gegebenenfalls sulfonierten kondensierten Ring bilden, R^{17} für Br steht, und R^2 und R^{12} unabhängig für Methyl oder Sulfopropyl stehen.

21. Verbindung nach einem der Ansprüche 13–20, wobei L für eine kovalente Verknüpfung steht, in der die Formel $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_e)_z-$ oder $-(CH_2)_d(CON(CH_2)_4NH(CH_2)_e)_z-$, $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_eNH_2)_z-$, $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_eNHCO)_z-$, worin d gleich 0–5, e gleich 1–5 und z' gleich 0 oder 1 ist, eingebaut ist.

22. Verbindung nach Anspruch 21, wobei L für $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_e)_z-$ steht.

23. Verbindung nach Anspruch 14, wobei R^3 für $-L-R^X$ steht.

24. Verbindung nach Anspruch 23, wobei R^X für eine Carbonsäure oder einen Succinimidylester einer Carbonsäure oder ein Maleinimid steht.

25. Verbindung nach Anspruch 14, wobei R^3 für $-L-S_c$ steht.

26. Verbindung nach Anspruch 25, wobei es sich bei S_c um ein Protein, ein Peptid oder eine Nukleinsäure handelt.

27. Verbindung nach einem der Ansprüche 23 bis 26, wobei L für $-(CH_2)_d(CONH(CH_2)_e)_z-$ steht, worin d gleich 0–5, e gleich 1–5 und z' gleich 0 oder 1 ist.

28. Verbindung nach einem der Ansprüche 23 bis 27, wobei R^4 für C_{1-22} -Alkyl steht.

29. Verbindung nach einem der Ansprüche 23 bis 28, wobei R^6 bis R^9 sowie R^{16} bis R^{19} unabhängig jeweils für Wasserstoff oder Sulfo stehen.

30. Verbindung nach Anspruch 29, wobei R^6 , R^8 , R^9 , R^{16} , R^{18} und R^{19} jeweils für Wasserstoff und R^7 und R^{17} jeweils für Sulfo stehen.

31. Verbindung nach einem der Ansprüche 23 bis 27, wobei R^4 für C_{1-22} -Alkyl steht und R^6 bis R^9 sowie R^{16} bis R^{19} unabhängig jeweils für Wasserstoff oder Sulfo stehen.

32. Verbindung nach Anspruch 31, wobei R^6 , R^8 , R^9 , R^{16} , R^{18} und R^{19} jeweils für Wasserstoff und R^7 und R^{17} jeweils für Sulfo stehen. Polymer, wobei man in dem Verfahren:

eine eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1–25 umfassende Farbstofflösung, vorausgesetzt, daß mindestens R^3 für $-L-R_x$ steht, mit einer ein Protein, Peptid oder Nukleinsäurepolymer umfassenden Probe zusammenbringt, wodurch ein Farbstoffkonjugat gebildet wird.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–32, worin $n = 1$ ist.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–32, worin $n = 2$ ist.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–32, worin $n = 3$ ist.

36. Verfahren zum Färben einer biologischen Probe, bei dem man: eine einen der in den Ansprüchen 1–35 beschriebenen Farbstoffe umfassende Farbstofflösung mit einer biologischen Probe in einer Konzentration, die ausreicht, um eine nachweisbare optische Reaktion unter den gewünschten Bedingungen zu erhalten, zusammenbringt.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei die Probe Zellen umfaßt.

38. Verfahren nach Anspruch 36, wobei die Probe Proteine oder Nukleinsäurepolymere in einem Mikroarray umfaßt.

39. Verfahren nach Anspruch 36, wobei die Probe einen Liganden umfaßt, bei dem es sich um ein Mitglied eines spezifischen Bindungspaares handelt, für das S_c ein komplementäres Mitglied darstellt.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36–39, wobei die Probe in oder auf einer festen oder halbfesten Matrix, bei der es sich um eine Membran, ein Elektrophoresegel, einen Siliciumchip, einen Glasobjektträger, eine Microwell-Platte oder einen mikrofluidischen Chip handelt, vorliegt.

41. Verfahren zur Bildung eines Farbstoffkonjugats eines Proteins, Peptids oder Nukleinsäurepolymers, wobei man in dem Verfahren:

eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1–35 umfassende Farbstofflösung unter der Voraussetzung, daß wenigstens R^3 für -L-R_x steht, mit einer ein Protein, Peptid oder Nukleinsäurepolymer umfassenden Probe zusammenbringt, wodurch ein Farbstoffkonjugat gebildet wird.

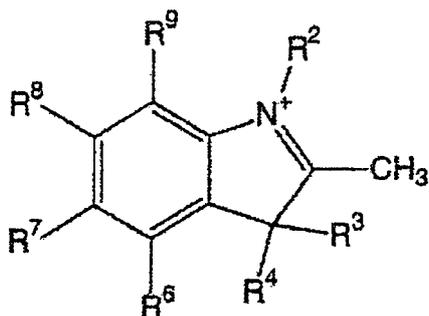
42. Kit zum Färben einer biologischen Probe, umfassend eine eine der in den Ansprüchen 1–35 beschriebenen Verbindungen oder deren Salze umfassende Farbstofflösung sowie einen zur Verwendung mit einer solchen Probe geeigneten Puffer.

43. Kit zur Bildung eines Farbstoffkonjugats eines Proteins, Peptids, Nukleotids oder eines Nukleinsäurepolymers, umfassend

eine eine der Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1–35 umfassende Farbstofflösung, vorausgesetzt, daß mindestens R^3 für -L-R_x steht, sowie

einen zur Verwendung mit dem Protein, Peptid, Nukleotid oder Nukleinsäurepolymer geeigneten Puffer.

44. Verbindung der Formel:



und ihre Salze, wobei

R^3 für C_3 - C_7 -Carboxyalkyl und R^4 für ein C_1 - C_6 -Alkyl steht,

R^2 für H oder ein C_1 - C_6 -Alkyl oder ein mit Sulfo substituiertes C_1 - C_6 -Alkyl steht,

R^6 bis R^9 unabhängig für H, Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder für C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, die jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind, stehen oder zwei beliebige benachbarte Substituenten von R^6 bis R^9 einen kondensierten Benzoring, der gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit Amino, Sulfo, Trifluormethyl oder Halogen oder mit C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_6 -Alkoxy, C_1 - C_6 -Alkylamino, C_2 - C_{12} -Dialkylamino, die jeweils gegebenenfalls ferner mit Carboxy, Sulfo, Amino oder Hydroxy substituiert sind, substituiert ist, bilden.

45. Verbindung nach Anspruch 44, wobei

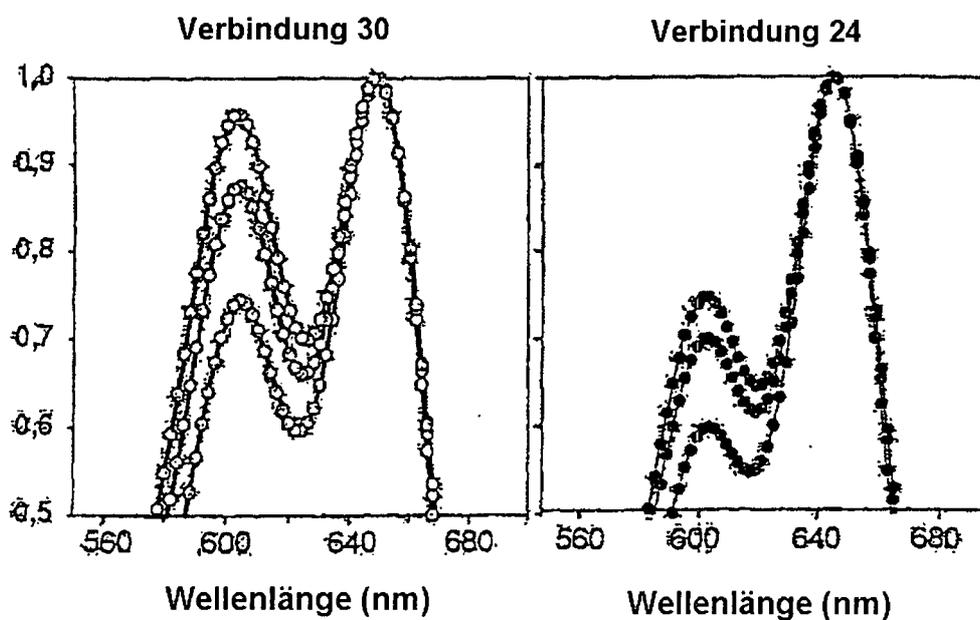
R^3 für C_5 - C_6 -Carboxyalkyl und R^4 für Methyl steht,

R^2 für Methyl oder Sulfopropyl steht,

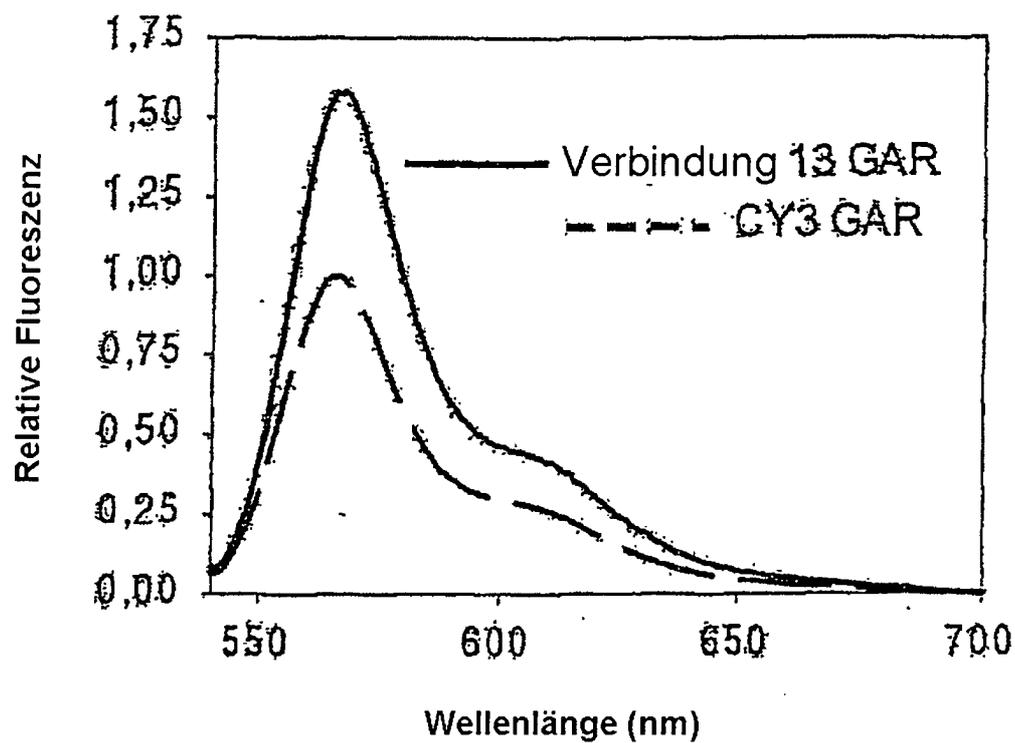
R^6 und R^7 einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit Sulfo substituierten kondensierten Benzoring bilden oder R^7 unabhängig für H oder Sulfo und R^6 für H steht, sowohl R^8 als auch R^9 für H stehen.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

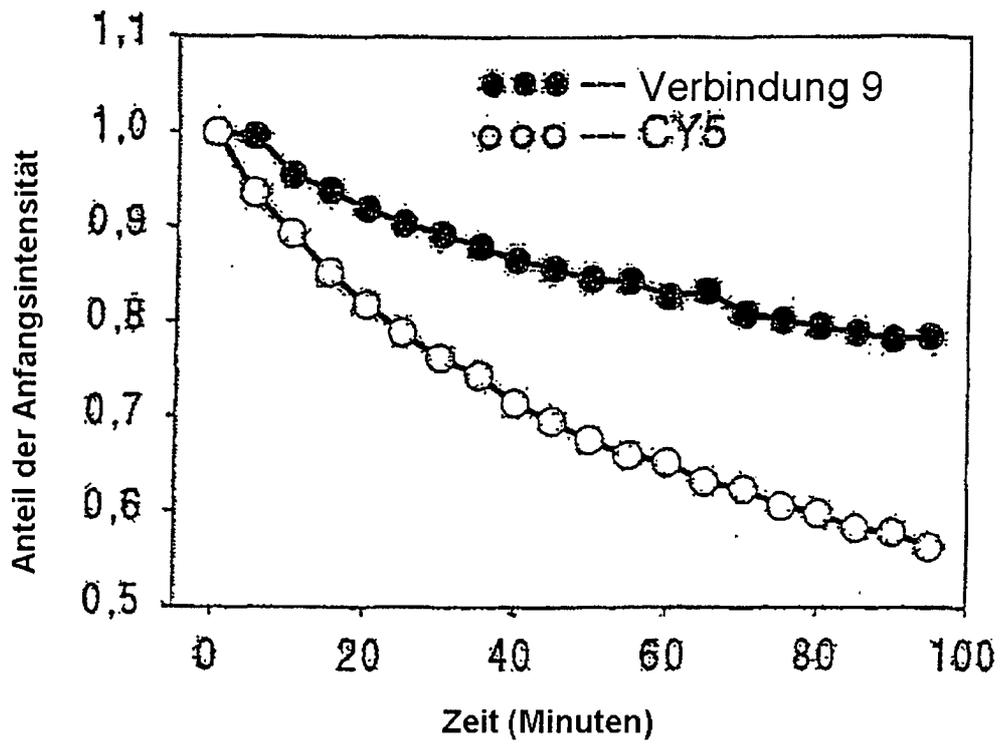
Figuren



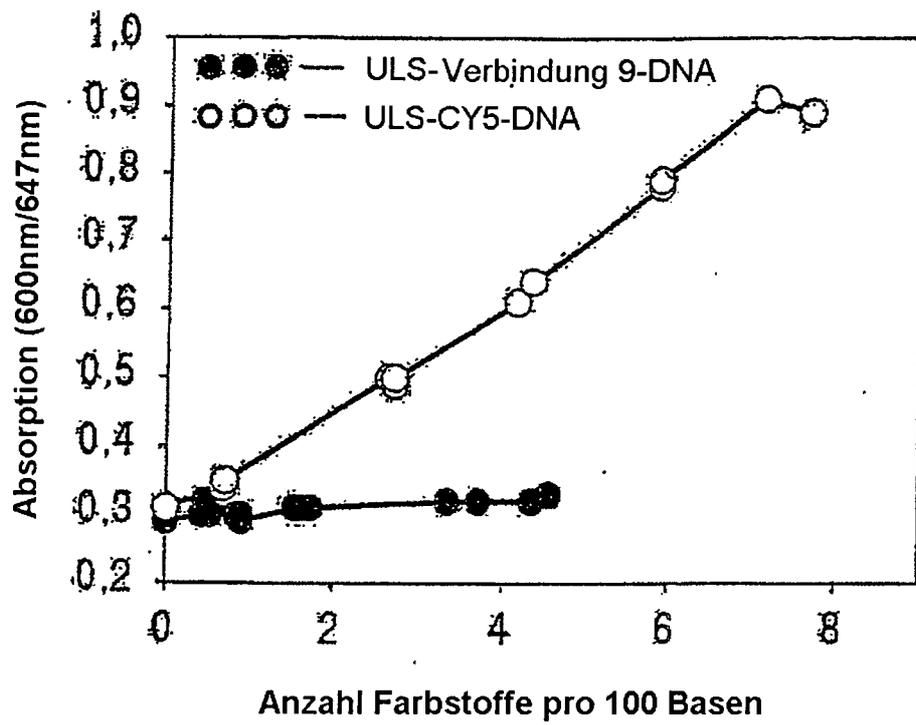
Figur 1



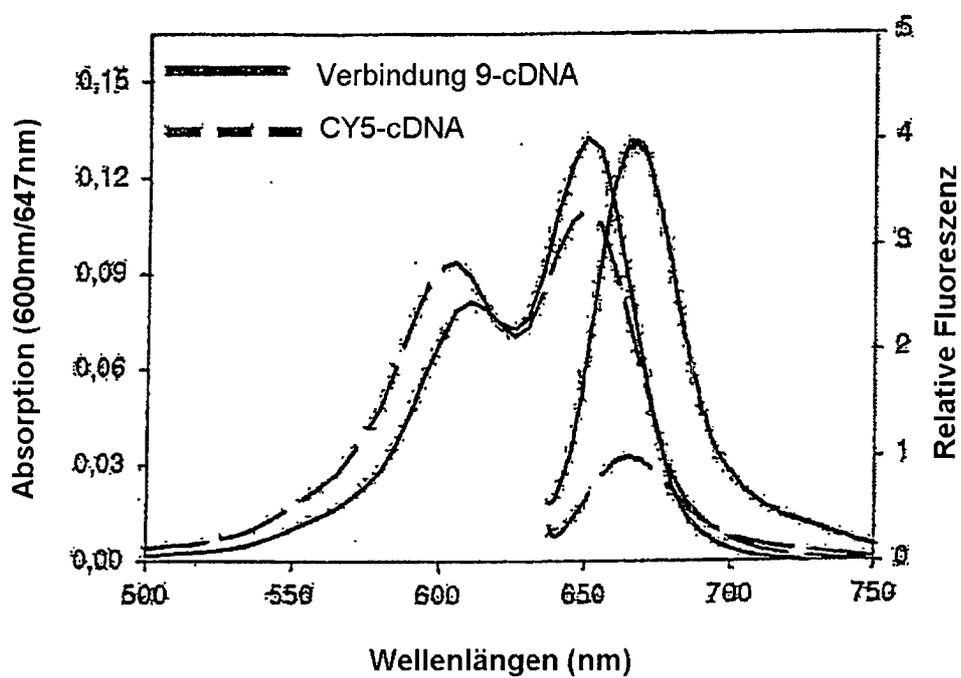
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5