



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 473 T2** 2006.02.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 100 520 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 473.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/16423**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 935 751.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/04914**

(86) PCT-Anmeldetag: **21.07.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.02.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.05.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/00** (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

C07D 309/00 (2006.01)

C07D 311/78 (2006.01)

C07D 311/82 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07D 493/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

93642 P **21.07.1998** **US**

(73) Patentinhaber:

Cytovia, Inc., San Diego, Calif., US

(74) Vertreter:

Becker, Kurig, Straus, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ZHANG, Han-Zhong, San Diego, US; CAI, Xiong,
Sui, San Diego, US; DREWE, A., John, Carlsbad,
California 92009, US; YANG, Wu, Irvine, US**

(54) Bezeichnung: **NEUE FLUORESCENZFARBSTOFFE UND IHRE ANWENDUNG IN FLUORESCENZNACHWEIS-
VERFAHREN GANZER ZELLEN FÜR KASPASEN, PEPTIDASEN, PROTEASEN UND ANDERE ENZYME SOWIE
DEREN VERWENDUNG**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet des intrazellulären Nachweises von Enzymen unter Verwendung von fluorogenen oder fluoreszierenden Proben. Die Erfindung betrifft neue Fluoreszenzfarbstoffe und die Verwendung dieser Farbstoffe zur Herstellung von neuen fluorogenen oder fluoreszierenden Peptiden oder Aminosäurederivaten, die Substrate von Proteasen und Peptidasen sind. Insbesondere betrifft die Erfindung neue fluorogene oder fluoreszierende Peptidderivate, die Substrate von Enzymen sind, die bei der Apoptose involviert sind, wie Caspasen und die von Lymphozyten abgeleitete Serinprotease Granzym B. Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate können in einem Verfahren zur Messung der Aktivität von Caspasen und anderen Enzymen verwendet werden, die bei der Apoptose von lebenden oder toten Gesamtzellen eingeschlossen sind, Zelllinien oder Gewebeproben, abgeleitet von jeglichem gesunden, kranken, infizierten oder kanzerogenen Organ oder Gewebe. Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate können ebenfalls in einem neuen Assay-System zum entdecken oder nachweisen von Inhibitoren oder Induktoren von Apoptose in Compound-Zusammensetzungen oder Compound-Büchereien verwendet werden. Weiterhin können die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate verwendet werden zur Bestimmung der Sensitivität von Krebszellen auf die Behandlung mit chemotherapeutischen Medikamenten. Die Erfindung betrifft ebenfalls neue fluorogene oder fluoreszierende Peptidderivate, die Substrate von Exopeptidasen sind, wie Aminopeptidase A und N, Methionin Aminopeptidase und Dipeptidyl-Peptidase IV, Endopeptidase wie Calpain, Proteasen wie HIV Proteasen, HCMV Protease, HSV Protease, HCV Protease und Adenovirus Protease.

Verwandter Stand der Technik

[0002] Organismen eliminieren unerwünschte Zellen mittels eines Verfahrens, das verschiedentlich als regulierter Zelltod, programmierter Zelltod oder Apoptose bekannt ist. Solch ein derartiger Zelltod kommt als normaler Aspekt einer Tierentwicklung als auch bei Gewebehomeostase und Alterung vor (Glucksmann, A., Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 26:59-86 (1951); Glucksmann, A., Archives de Biologie 76:419-437 (1965); Ellis et al., Dev. 112:591-603 (1991); Vaux et al., Cell 76:777-779 (1994)). Apoptose reguliert die Zellzahl, erleichtert Morphogenese, entfernt gefährliche oder in anderer Weise abnormale Zellen und eliminiert Zellen, die bereits ihre Funktion erfüllt haben. Ergänzend kommt Apoptose als Antwort auf verschiedenen physiologischen Streß, wie Hypoxie oder Ischämie vor (veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 96/20721).

[0003] Es gibt eine Zahl von morphologischen Veränderungen, welche von Zellen beigetragen werden, die einen regulierten Zelltod erfahren, einschließlich Plasma und nuklearer Membran, Blasenbildung, Zellschrumpfung (Kondensation von Kernprotoplasma und Zytoplasma), organischer Relokalisation und Verdichtung, Chromatinkondensation und Produktion von apoptotischen Körpern (Membran, eingeschlossen in Partikeln, die intrazelluläres Material enthalten) (Orrenius, S., J Internal Medicine 237:529-536 (1995)).

[0004] Apoptose wird erreicht durch einen endogenen Mechanismus von zellulärem Selbstmord (Wyllie, A. H., in Cell Death in Biology and Pathology, Bowen and Lockshin, eds., Chapman and Hall (1981), pp. 9-34). Eine Zelle aktiviert ihr intern verschlüsseltes Selbstmordprogramm als ein Ergebnis von internen oder externen Signalen. Das Selbstmordprogramm wird durchgeführt durch die Aktivierung eines sorgfältig regulierten genetischen Programms (Wyllie et al., Int. Rev. Cyt. 68:251 (1980); Ellis et al., Ann. Rev. Cell Bio. 7:663 (1991)). Apoptotische Zellen und Körper werden üblicherweise erkannt und mittels Nachbarzellen oder Makrophagen bevor Lyse gereinigt. Aufgrund des Reinigungsmechanismus wird eine Entzündung nicht induziert trotz der Reinigung einer großen Zahl von Zellen (Orrenius, S., J. Internal Medicine 237:529-536 (1995)).

[0005] Säugetier interleukin-1 β (IL-1 β) spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen pathogenen Prozessen, einschließlich chronischer und akuter Entzündung und autoimmun Krankheiten (Oppenheim, J.H., et al., Immunology Today, 7:45-56 (1986)). IL-1 β wird synthetisiert als ein zell-assoziiertes Precursorpolypeptid (Pro-IL-1 β), welches nicht in der Lage ist, an IL-1 Rezeptoren zu binden und biologisch inaktiv ist (Mosley et al., J. Biol. Chem. 262:2941-2944 (1987)). Durch Hemmung der Umwandlung von Precursor IL-1 β zu gereiftem IL-1 β , wird die Aktivität von interleukin-1 gehemmt. IL-1 ist ebenfalls ein Zytokin, welches in der Mediation eines breiten Bereiches von biologischen Antworten eingeschlossen ist, umfassend Entzündungen, septischen Schock, Wundheilung, Hämatopoese und Wachstum von bestimmten Leukämien (Dinarello, C.A., Blood 77:1627-1652 (1991); diGiovine et al., Immunology Today 11:13 (1990)). Interleukin-1 β konvertierendes Enzym (ICE) ist eine Protease, die für die Aktivierung von interleukin-1 β (IL-1 β) verantwortlich ist (Thornberry, N.A., et al., Nature 356:768 (1992); Yuan, J., et al., Cell 75:641 (1993)). ICE ist eine Substratspezifische Cysteineprotease, die inaktives prointerleukin-1 spaltet, um das gereifte IL-1 zu bilden. Die Gene die für ICE und

CPP32 kodieren sind Mitglieder der Säugetier ICE/Ced-2 Familie von Genen, die gegenwärtig wenigstens zwölf Mitglieder umfassen: ICE, CPP32/Yama/Apopain, mICE2, ICE4, ICH1, TX/ICH2, MCH2, MCH3, MCH4, FLICE/MACH/MCHS, ICE-LAP6 und ICe1III. Die proteolytische Aktivität dieser Familie von Cysteinproteasen, deren aktive Seite Cysteinreste enthält, ist wesentlich für ICE vermittelte Apoptose, erscheint kritisch in vermitteltem Zelltod (Miura et al., Cell 75:653-660(1993)). Die Genfamilie wurde kürzlich Caspasen genannt (Alnemi, E.S., et al. Cell, 87:171 (1996)). Ein Tod Auslöser wie Tumor Nekrose Faktor, FAS-Ligand, Sauerstoff oder Nahrungsmittelentzug, Viren, Toxine, Anti-Krebs Medikamente, etc. kann Caspasen innerhalb von Zellen in einer Kaskaden ähnlichen Weise aktivieren, wobei in der Kaskade vorgeschaltete Caspasen (z. B. FLICE/MACC/MCHS) Caspasen weiter unten in der Kaskade (z. B. CPP-32/Yama/Apopain) aktivieren können. Aktivierung der Caspase Kaskade führt zu Zelltod.

[0006] Eine Großzahl von wissenschaftlichen Beweisen schlägt vor, dass in vielen Krankheiten die Caspase Kaskade aktiviert ist, wenn sie nicht aktiviert sein sollte. Dies führt zu extensivem Zellselbstmord und Organversagen. Krankheiten die eine ungeeignete Aktivierung der Caspase Kaskade einschließen und nachfolgenden Zellselbstmord umfassen, schließen myokardiale Infektion, kongestives Herzversagen, Autoimmunkrankheiten, AIDS, virale Infektionen, Nierenversagen, Leberversagen, rheumatische Arthritis, ischämischer Schlag, neurodegenerative Krankheiten, Atherosklerose etc. ein. Daher kann die Entdeckung von neuen Medikamenten, die die Aktivierung der Caspase Kaskade hemmen oder blockieren einen großen, weitreichenden Einfluß auf die Behandlung von degenerativen Krankheiten von den meisten, wenn nicht von allen Organsystemen des organischen Körpers, haben.

[0007] Zusammenfassend wird von Caspasen angenommen, dass sie bei der Entwicklung und Behandlung von Krebs eine wichtige Rolle spielen. Es gibt eine erhöhte Anzahl von Beweisen, dass Krebszellen, während sie Caspasen enthalten, einen Teil der molekularen Maschinerie verlieren, die die Caspase Kaskade aktivieren (Los et al., Blood, Vol. 90, No 8:3118-3129 (1997)). Dies veranlaßt die Krebszellen ihre Fähigkeit zu verlieren, einen zellulären Selbstmord durchzuführen und die Zellen werden unsterblich – sie werden kanzerogen.

[0008] Es wurde gezeigt, dass chemotherapeutische (Anti-Krebs) Medikamente Krebszellen triggern können, um Zelltod durchzumachen, durch Reaktivieren der ruhenden Caspase Kaskade. Dies kann ein kritischer Aspekt der Handlungsweise von den meisten, aber nicht von allen bekannten Anti-Krebs Medikamenten sein (Los et al., Blood, Vol. 90, No 8:3118-3129 (1997); Friesen et al., Nat. Med. 2:574 (1996)). Chemotherapeutische Medikamente können sich in ihrer Kapazität unterscheiden, um das Caspase-System in verschiedenen Arten von Krebs zu aktivieren. Weiterhin ist es möglich, dass sich Krebsmittel in ihrer Fähigkeit unterscheiden, die Caspase Kaskade bei vorhandenem Krebs (z. B. Lungenkrebs) und bei verschiedenen Patienten zu aktivieren. Mit anderen Worten heißt dies, dass es Unterschiede von einem Patienten zu dem anderen bei der Chemosensitivität gibt, z. B. bei Lungenkrebszellen auf verschiedene Krebsmittel.

[0009] Im Ergebnis spielt die exzessive Aktivierung der Caspase Kaskade eine wichtige Rolle bei der großen Anzahl von degenerativen Organkrankheiten, während ein nicht funktionierendes Caspase-System ein besonderes Kennzeichen von Krebszellen ist. Von neuen Medikamenten, die die Caspase Kaskade hemmen oder stimulieren wird angenommen, dass sie möglicherweise die Behandlung von einer Anzahl von menschlichen Krankheiten von Infektionen, kardiovaskulären, endokrinen, Nieren-, Leber und Gehirnerkrankheiten bis zu Krankheiten des Immunsystems und Krebs revolutionieren werden.

[0010] Um Medikamente zu finden, die entweder die Caspase Kaskade hemmen oder stimulieren, ist es notwendig, Tests mit einem hohen Durchsatz bezüglich der Caspase Aktivierung (HTCA) zu entwickeln. Diese HTCA Tests müssen in der Lage sein, die Aktivierung oder Hemmung der Caspase Kaskade innerhalb der lebenden oder gesamten Zelle zu verfolgen. Idealerweise sollten die HTCA Tests vielseitig genug sein, um die Caspase Kaskade Aktivität innerhalb jeder lebenden Zelle oder der Gesamtzelle ohne Berücksichtigung der Herkunft der Zelle zu messen. Weiterhin sollten derartige HTCA Tests in der Lage sein innerhalb der lebenden oder Gesamtzelle die Aktivierung oder Hemmung von jeglichen Caspasen Enzymen oder jeglichen anderen Enzymen, die bei der Caspase Kaskade eingeschlossen sind, zu messen. Entwicklungen von solchen vielseitigen HTCA Tests stellen einen wesentlichen Fortschritt auf dem Gebiet des Drogen-Screenings dar.

[0011] Zur Zeit erhältliche HTCA Tests erlauben kein innerzelluläres Screening für Verbindungen, die entweder die Caspase Kaskade aktivieren oder hemmen können. Es gibt lediglich zellfreie Screening Tests mit hohem Durchsatz, die die Aktivität von individuell isolierten Caspase Enzymen messen können oder die die Aktivität von Caspasen in toten Zellen messen können, die mittels osmotischem Schock permeabilisiert worden sind (Los et al., Blood, Vol. 90, No 8:3118-3129 (1997)). Diese zellfreien Enzymtests können nicht den Effekt einer Verbindung auf die Caspase Kaskade bei lebenden Zellen aufgrund der folgenden Gründe vorhersagen:

1) Zellfreie Tests oder Tests, die tote, permeabilisierte Zellen verwenden, können nicht die Fähigkeit von Verbindungen voraussagen, die zur Zellmembran penetrieren. Dies ist kritisch, da die Caspase Kaskade in dem inneren der Zellen vorkommt. Um aktiv zu sein, muss eine Verbindung nicht nur die Fähigkeit besitzen, die Caspase Enzyme oder Enzyme zu modellieren, aber sie muss in der Lage sein, die intakte Zellmembran zu penetrieren. Zellfreie Tests oder Tests unter Verwendung von toten Zellen sind daher ungeeignet, um zu bestimmen, ob oder ob nicht eine Verbindung potentiell als Droge nützlich ist oder nicht.

2. Isolierte Caspasen in einem zellfreien Test sind hochempfindlich gegenüber Oxidation und gegenüber Verbindungen, die Oxidation der Enzyme verursachen können. Diese Eigenschaft der isolierten Caspasen macht die zellfreien Caspase Screening Tests hoch empfindlich gegenüber oxidativen Verunreinigungen und hat diese erfolgreich von der Verwendung von Tests ausgeschlossen für Screenings von kombinatorischen oder anderen chemischen Büchereien mit hohem Durchsatz. Vorhergehende Massen-Screening Methoden unter Verwendung von zellfreien Caspasen Enzymtests haben zu der Entdeckung von einer Vielzahl von Inhibitoren geführt, die Caspasen oxidieren, aber zu keiner Verbindung, die als potentielle Droge nützlich wäre.

3. Eine Vielzahl von zellulären Rezeptoren, Proteinen, Zellbestandteilen und Co-Faktoren, von denen viele bis jetzt noch nicht bekannt sind, können die Caspase Kaskade in den lebenden Zellen beeinflussen. Zellfreie Caspase Tests oder Tests, welche permeabilisierte, tote Zellen benutzen, ziehen diese zelluläre Rezeptoren und Co-Faktoren nicht in Betracht. Aufgrund dieser Tatsache ist es möglich, dass eine in einem zellfreien oder Zelltod Caspase Test identifizierte Verbindung nicht in einer lebenden Zelle wirken wird. Auf der anderen Seite würde eine Verbindung, die die Caspase Kaskade hemmen oder stimulieren würde indirekt durch eine der zellulären Rezeptoren oder Co-Faktoren gänzlich in einem zellfreien oder einem toten Zell-Caspase Test fehlen.

4. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Caspase Kaskade unterschiedlich in Zellen von unterschiedlichen Organen funktioniert. Es gibt ansteigende Nachweise dafür, dass sich die Rezeptoren und Co-Faktoren, die die Caspase Kaskade beeinflussen, innerhalb verschiedener Zelltypen unterscheiden. Unter Verwendung von zellfreien oder toten Zell-Tests wird es sehr wahrscheinlich unmöglich sein, die Zelltypen oder organspezifischen Modulatoren der Caspase Kaskade zu identifizieren.

[0012] Eine potentielle wichtige Anwendung eines HTCA Testsystems zum Messen von intrazellulären Caspase Enzymen oder jeglichen anderen Enzymen, die bei der Apoptose eingeschlossen sind, ist das chemosensitive testen von menschlichen Krebsarten. Es ist bekannt, dass es einen genetischen Unterschied in der Suszeptibilität von menschlichen Krebsarten auf gegenwärtig vermarktete Krebsmittel gibt. Zum Beispiel können Lungenkrebszellen in einem Patienten sensitiv gegenüber Droge A sein, während der Lungenkrebs eines anderen Patienten nicht empfindlich gegenüber Droge A, aber empfindlich gegenüber Droge B ist. Dieser pharmacogenetische Unterschied bezüglich der Chemosensitivität von Krebszellen von unterschiedlichen Individuen ist ein sehr bekanntes Phänomen.

[0013] In der Vergangenheit wurden an unterschiedlichen Patienten Versuche unternommen, vor dem Unterziehen einer Behandlung mit einem oder mehreren von vermarkteten Krebsmitteln, um die Chemosensitivität von Krebszellen zu bestimmen. Jedoch wurde gefunden, dass die Chemosensitivitätstestung nicht weit verbreitet war, weil die eingeschlossenen Verfahren einige inhärente technische Schwierigkeiten aufweisen. Das Testen ist sehr zeitaufwendig (sechs oder mehr Tage pro Screen) und dies benötigt die Kultivierung von Zellen vor dem Screening. Die Zellkultur führt zur klonalen Auswahl von Zellen und die kultivierten Zellen sind nicht länger repräsentativ für den Krebs des Patienten. Ein HTCA Testsystem zum schnellen Messen von intrazellulärer Caspase Aktivität könnte verwendet werden, um sehr schnell das Chemosensitivitätsprofil von frisch entnommenen Krebszellen zu bestimmen. Wenn der Test einen hohen Durchsatz hat, würde er brauchbar sein, um die Chemosensitivität von mehrfach Proben, die von dem gleichen Patienten, z. B. von unterschiedlichen Metastasen genommen wurden, zu testen. Diese Information könnte dann verwendet werden, um eine Behandlungsweise zu kreieren unter Verwendung von markierten Krebsmitteln, auf die die Zellen die größte Sensitivität zeigten.

[0014] Es ist klar, dass hier ein Bedürfnis für HTCA Tests und Reagenzien für derartige Tests existiert, die verwendet werden können bei der Medikamentenentwicklung oder bei diagnostischen Verfahren, um schnell die Aktivität von Verbindungen zu detektieren und zu messen, die die Caspase Kaskade oder andere Enzyme, eingeschlossen bei der Apoptose im inneren von lebenden oder toten Zellen aktivieren oder inhibieren. Ein Mittel für diesen Typ von Zelltests sollte idealerweise die folgenden Bedingungen aufweisen: a) es sollte ein großer Unterschied bei dem Fluoreszenzsignal zwischen Peptid-Reportermolekül und dem Reportermolekül sein, nach dem die Amidbindung im Peptid-Reportermolekül mittels der Caspasen oder anderen Enzymen, die beim Zelltod eingeschlossen sind, getrennt worden ist, vorzugsweise sollte das Peptid-Reportermolekül nicht fluoreszierend sein und besonders bevorzugt sollte das Peptid-Reportermolekül nicht fluoreszierend und farblos

sein; b) das Peptid-Reportermolekül sollte zellpermeabel sein, daher sollte eine geringe Anzahl von hydrophilen Gruppen in dem Molekül sein und die Größe des Moleküls sollte vorzugsweise klein sein; c) das Peptid-Reportermolekül sollte vorzugsweise nicht aus der Zelle diffundieren sobald es die Zellmembran permeiert; d) das Reportermolekül sollte vorzugsweise nicht aus der Zelle diffundieren sobald es von dem Peptid freigesetzt worden ist.

[0015] Das Verfahren zum Screening von Apoptose Inhibitoren oder Induktoren in Gesamtzellen gegenüber zellfreien Enzymtests kann ebenfalls zum Screening von Inhibitoren von Enzymen oder anderen als Caspasen verwendet werden. Traditionell werden Enzyminhibitoren zuerst durch zellfreie Enzymtests identifiziert. Zellkulturen werden dann für sekundäre Tests verwendet, um die Aktivität der aktiven Verbindungen in intakten Zellen zu bewerten. Ein zellpermeables fluorogenes oder fluoreszierendes Substrat wird das Screening von Inhibitoren von Proteasen und Peptidasen und anderen Enzymen direkt in lebenden Zellen ermöglichen. Es gibt viele Vorteile in Gesamtzelltests gegenüber zellfreien Enzymtests. Einer der Vorteile ist, dass in Gesamtzelltests der Inhibitor die Zelle penetrieren muss, um nachgewiesen zu werden. Da viele Proteasen in lebenden Zellen durch andere Proteine, Rezeptoren oder Gene, reguliert werden, wird das Screening unter Verwendung von lebenden Zellen die Identifikation von kleinen Molekülverbindungen erlauben, die mit den zellulären Proteasen interferieren durch Bindung an die aktive Seite als auch Verbindungen, die die Proteasefunktion modulieren durch interferieren mit der Transkription, Translation, Biosynthese, Untereinheit-Zusammensetzung, zellulären Co-Faktoren oder Signaltransduktionsmechanismen (oder viralem Eintritt in Wirtszellen, im Fall von viralen Proteasen). Weiterhin gibt es einen Überfluß von Aminopeptidasen in den Zellen, diese Aminopeptidasen können bei dem Design des fluorogenen oder fluoreszierenden Substrats für Gesamtzelltests verwendet werden, die andererseits nicht in zellfreien Testsystemen funktionieren. Daher gibt es ein Bedürfnis, HTS Tests und Reagenzien für derartige Test in Gesamtzellen zu entwickeln, die zur Drogenentwicklung oder für diagnostische Verfahren verwendet werden können.

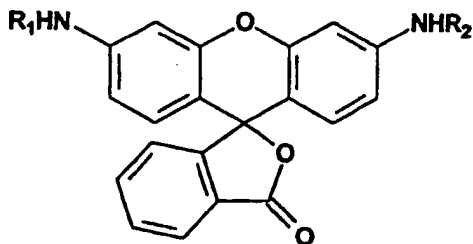
[0016] AGM-1470 (ebenfalls bekannt als TNP-470) ist ein angiogener Inhibitor in klinischen Versuchen für eine Vielzahl von Krebsarten. Der Mechanismus der Wirkung von AGM-1470 wurde kürzlich von zwei unabhängigen Forschergruppen entdeckt (Sin, N., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:6099-6103 (1997); Griffith, E.C., et al., Chem. Biol. 4:461-471 (1997)). Sie haben herausgefunden, dass AGM-1470 und Analoge Inhibitoren von Methionin Aminopeptidase Typ 2 (MetAP-2) sind. Das Potential zur Hemmung von endothelialer Zellproliferation und Hemmung von Methionin Aminopeptidase Aktivität wurde gemessen für eine Serie von AGM-1470 Analoger und eine signifikante Korrelation zwischen zwei Aktivitäten wurde gefunden.

[0017] Da angiogenese Inhibitoren dafür bekannt sind, dass sie in der Lage sind, selektiv Krebszellen zu töten, kann ein zellulärer Screening-Test für Inhibitoren von MetAP-2 in einem neuen Anti-Krebs Mittel resultieren. Daher können permeable fluorogene oder fluoreszierende Substrate für MetAP-2 verwendet werden, zum Screening von Inhibitoren von MetAP-2 in endothelialen Zellen, die zu neuen Anti-Krebs Mitteln führen können.

[0018] Kürzlich wurde gezeigt, dass HIV Protease Inhibitoren wie Ritonavir und Viracept sehr effektiv bei der Behandlung von Patienten sind, die mit HIV infiziert sind. Diese Inhibitoren wurden designed, basierend auf der Struktur der HIV Protease Substrate. Die Aktivitäten dieser Inhibitoren wurden zuerst gegen HIV Protease bestimmt. Aktive Verbindungen wurden dann zur Inhibierung der HIV Infektion in Zellkulturen getestet. Ein zellpermeables fluorogenes oder fluoreszierendes Substrat für HIV Protease kann verwendet werden für das Screening von HIV Protease Inhibitoren in HIV infizierten Zellen, die den Prozeß für die Entdeckung von neuen HIV Protease Inhibitoren beschleunigen könnten, und die zu neuen und besseren Behandlungen von HIV Infektionen führen könnten. Da HIV Protease virale Precursor Proteine in einem Zustand bei der viralen Replikation produziert, kann ein zellpermeables fluorogenes oder fluoreszierendes Substrat für HIV Protease ebenfalls verwendet werden, um Verbindungen zu screenen, die Gen Transkription oder Translation, viralen Eintrag oder andere Schlüsselproteine in dem frühen Stadium der HIV Infektion inhibieren. Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate können ebenfalls für die Diagnose von HIV Infektion verwendet werden, die sensitiver als die zur Zeit verwendeten Methoden sind.

[0019] Unter Verwendung des gleichen Prinzips können zellpermeabel fluorogene oder fluoreszierende Substrate für Cathepsin B verwendet werden für das Screening von Cathepsin B Inhibitoren. Zellpermeable fluorogene oder fluoreszierende Substrate für Dipeptidyl-Peptidase IV kann verwendet werden für das Screening von Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibitoren. Zellpermeable fluorogene oder fluoreszierende Substrate für Renin können verwendet werden für das Screening von Renin Inhibitoren und zellpermeabel fluorogene oder fluoreszierende Substrate für Adenovirus Protease oder andere virale Protease können verwendet werden für das Screening von Adenovirus Protease oder andere virale Protease Inhibitoren.

[0020] U.S. Patente mit den Nummern 4,557,862 und 4,640,893 beschreiben Rhodamin 110 Derivate als fluorige Substrate für Proteinase der Formel:



worin R_1 und R_2 , die gleich oder unterschiedlich sein können, ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Aminosäuren, Aminosäurederivaten, blockierten Aminosäuren, blockierten Aminosäurederivaten und Peptiden. Beispiele von $(AA)_2$ -Rhodamin und $(\text{Peptid})_2$ -Rhodamin sind (Z-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Ala-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Gln-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Glu-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Gly-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Leu-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Met-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Phe-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Pro-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Trp-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, (Z-Val-Arg) $_2$ -Rhodamin 110, und (Z-Ile-Pro-Arg) $_2$ -Rhodamin 110.

[0021] WO 96/36729 beschreibt Verbindungen oder ihre Salze zum Testen der Aktivität eines Enzyms innerhalb einer metabolisch aktiven Gesamtzelle. Die Testverbindung ist diejenige, die eine abgehende Gruppe und eine Indikatorgruppe umfasst. Die abgehende Gruppe ist ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Aminosäuren, Peptiden, Sacchariden, Sulfaten, Phosphaten, Estern, Phosphatestern, Nukleotiden, Polynukleotiden, Nukleinsäuren, Pyrimidinen, Purinen, Nukleosiden, Lipiden und Mischungen. Die Indikatorgruppe ist ausgewählt aus Verbindungen, die einen ersten Zustand haben, wenn sie mit der verlassenen Gruppe verknüpft sind, und einen zweiten Zustand, wenn die verlassende Gruppe abgespalten wird von der Indikatorgruppe durch ein Enzym. Bevorzugte Indikatorverbindungen sind diejenigen, die Rhodamin 110, Rhodol, und Fluorescein und Analoge dieser Verbindungen sind.

[0022] U.S. Patent Nr. 5,576,424 beschreibt Haloalkylderivate von Reportermolekülen, die verwendet werden, um metabolische Aktivität in Zellen der Formel:

XR-SPACER-REPORTER-BLOCK

zu analysieren.

[0023] In welcher -BLOCK eine Gruppe ist, die ausgewählt ist, um entferntbar zu sein, durch die Aktion eines spezifischen Wirkagenses, um dem Reporter spektrale Eigenschaften zu verleihen, die unterschiedlich von denen des Substrats sind; -REPORTER- ein Molekül ist, das, wenn es nicht länger an den Block durch eine BLOCK-REPORTERBINDUNG gebunden ist, spektrale Eigenschaften aufweist, die unterschiedlich von denen des Substrats sind; -SPACER- eine kovalente Bindung ist; und XR eine Haloalkylhälfte ist, die dann kovalent mit einem intrazellulären Thiol reagieren kann, um ein Thioetherkonjugat zu bilden. Bevorzugte Reporterverbindungen sind diejenigen, die Rhodamin-110, Rhodol, Fluorescein und andere umfassen.

Zusammenfassung der Erfindung

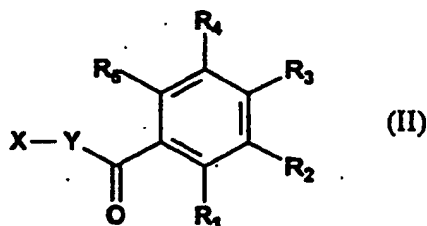
[0024] Die hier vorliegende Erfindung betrifft fluorige oder fluoreszierende Reporterverbindungen der allgemeinen Formel I:

X-Y-Z

(I)

oder biologisch akzeptabel Salze oder Pro-Reportermoleküle (wie Methyl oder Ethylesterformen von carboxylenthaltenden Aminosäureresten) davon, worin X ein Peptid, eine Aminosäure oder eine andere Struktur ist, derart, dass die Verbindung der Formel I ein Substrat für Caspasen oder andere Proteasen oder Peptidasen oder andere Enzyme ist; und worin X-Y die Scherenbindung ist. Z ist eine halogensubstituierte benzoylgeblockte Gruppe und die Y-Z Bindung ist keine zu spaltende Bindung. Y ist eine fluorige oder fluoreszierende Hälfte, vorzugsweise ein Rhodamin, umfassend aber nicht limitiert auf Rhodamin 110, Rhodamin 116, Rhodamin 19 und Sulforhodamin. Besonders bevorzugt ist Y Rhodamin 110. Bevorzugt ist Z eine multifluorsubstituierte Benzoylgruppe und besonders bevorzugt Pentafluorbenzoyl und Tetrafluorbenzoyl.

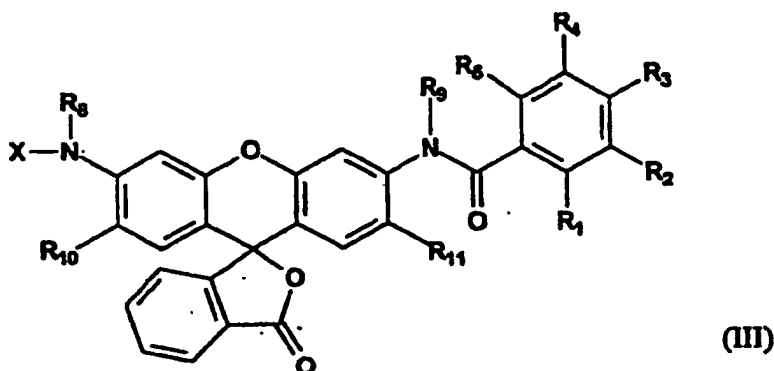
[0025] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung Verbindungen zur Verfügung, die durch die Formel II dargestellt werden:



oder biologisch akzeptabel Salze davon oder Pro-Reportermoleküle davon, worin X ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten und einem Peptid und Y ist eine fluoreszierende Hälfte.

[0026] R_1 - R_5 sind unabhängig Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Haloalkyl, Aryl, Cycloalkyl, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Aralkyl, Arylalkynyl, Hydroxyalkyl, Nitro, Amino, Cyano, Acyl (Alkanoyl), Acylamino, Hydroxy, Acyloxy, Alkoxy, Alkylthio, oder Carboxy, mit der Maßgabe, dass wenigstens einer von R_1 , R_3 oder R_5 Fluor oder Chlor ist. Vorzugsweise sind drei von R_1 - R_5 Fluor, besonders bevorzugt vier der R_1 - R_5 sind Fluor, und ganz besonders bevorzugt sind R_1 - R_5 alle Fluor.

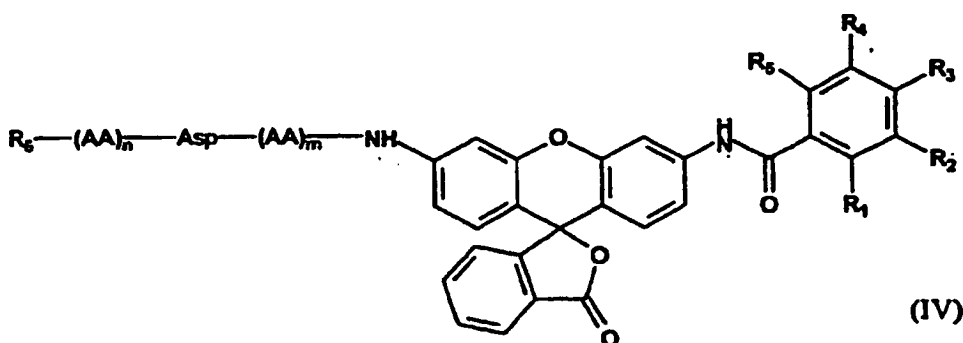
[0027] Besonders bevorzugte Verbindungen werden dargestellt durch Formel III:



oder biologisch akzeptable Salze oder Pro-Reportermoleküle (wie Methylester aus carboxylenthaltenden Aminosäureresten) davon, worin X und R_1 - R_5 wie vorher in Form ID definiert sind; R_8 und R_9 gleich oder unterschiedlich sind und sind unabhängig voneinander, Wasserstoff, Alkyl oder Aryl; und R_{10} und R_{11} gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl sind.

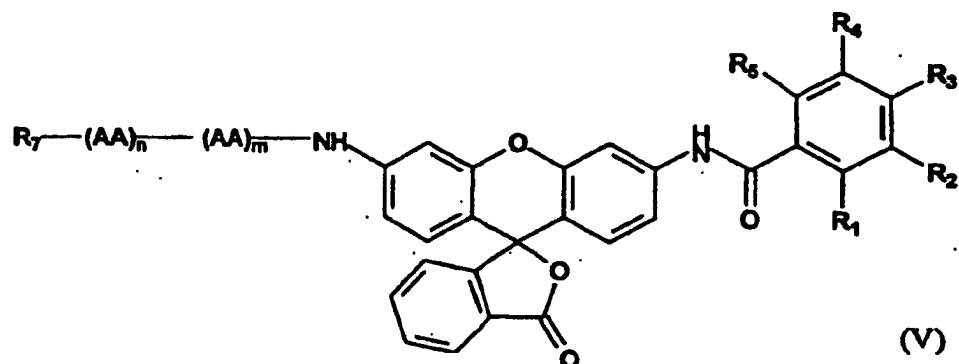
[0028] Bevorzugt sind R_8 und R_9 Wasserstoff, Methyl oder Ethyl und R_{10} und R_{11} sind Wasserstoff oder Methyl. Besonders bevorzugt sind R_8 und R_{11} Wasserstoff.

[0029] Spezifisch sind eine Klasse der neuen fluorogenen oder fluoreszierenden Reporterverbindungen der Erfindung diejenigen von Formel IV:



oder biologisch akzeptabel Salze oder Pro-Reportermoleküle davon, worin R_1 - R_5 wie vorher in Formel II definiert sind; und R_6 eine N-terminale Schutzgruppe, wie z. B. t-Butyloxycarbonyl, Acyl, Benzyloxycarbonyl und Pentafluorbenzoyl ist. Jedes AA unabhängig voneinander ist jeglicher natürlicher oder nicht natürlicher Aminosäure, n ist eine ganze Zahl von 0 bis 5 und m ist eine ganze Zahl von 0 bis 3.

[0030] Eine andere Klasse der neuen fluorogenen oder fluoreszierenden Reporterverbindungen der Erfindung sind die von Formel V:



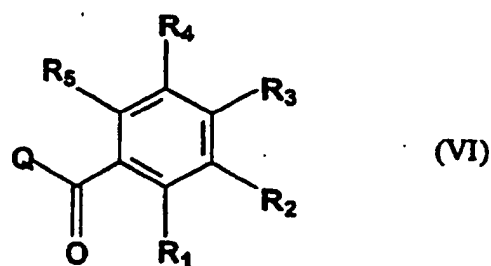
oder biologisch akzeptable Salze oder Pro-Reportermoleküle davon, worin:

R_1 - R_5 , AA, n und m wie in den Formeln ID und N definiert sind; und

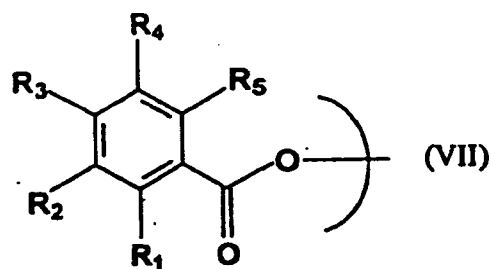
R_7 ist eine N-terminale Schutzgruppe, umfassend t-Butyloxycarbonyl, Acyl, Benzyloxycarbonyl und Pentafluorbenzoyl. R_7 kann ebenfalls H sein.

[0031] Bestimmte Gly-enthaltende Verbindungen von Formel IV können durch ein Verfahren erhalten werden, umfassend die Schritte:

(a) Reagieren von Rhodamin mit einer Verbindung der Formel (VI)



worin R_1 - R_5 wie oben definiert sind und Q ist Halogen, Hydroxy oder eine Gruppe der Formel VII:



worin R_1 - R_5 wie oben definiert sind,

um das substituierte Benzoyl-Rhodamin von Formel VIII zu ergeben;

(b) Kondensieren des substituierten N-benzoyl-Rhodamins zusammen mit N-Z-Gly um N-Z-Gly-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;

(c) Entfernen der Z-Gruppe um N-Gly-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;

(d) Kondensieren des N-Gly-N'-substituierten Benzoyl-Rhodamins mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t) um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t)-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und

(e) Entfernen der OBu-t Schutzgruppe um N-(Z-(AA)_n-Asp-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;

[0032] In einem derartigen Verfahren kann die substituierte Benzoylgruppe Pentafluor-substituiert sein.

[0033] Alternativ kann der Schritt des Einbringens von Gly vermieden werden und eine Verbindung der allgemeinen Formel IV kann erhalten werden durch ein Verfahren, umfassend die Schritte:

(a) Reagieren von Rhodamin mit einer Verbindung der Formel VI um N-substituiertes Benzoyl-Rhodamin der Formel VIII zu ergeben;

(b) Kondensieren des substituierten N-Benzoyl-Rhodamins mit Z-(AA)_n-Asp(-OBu-t) um

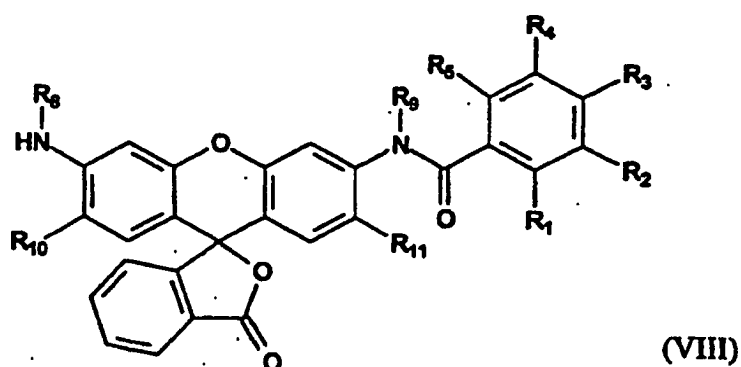
N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t))-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;

(c) Entfernen der OBU-t Schutzgruppe um N-(Z-(AA)_n-Asp)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben.

[0034] In diesem Verfahren, bei dem (AA)_n Aminosäuren, wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure umfasst, kann die Carboxylgruppe geschützt sein durch eine OBU-t Gruppe, die im letzten Schritt abgespalten werden kann.

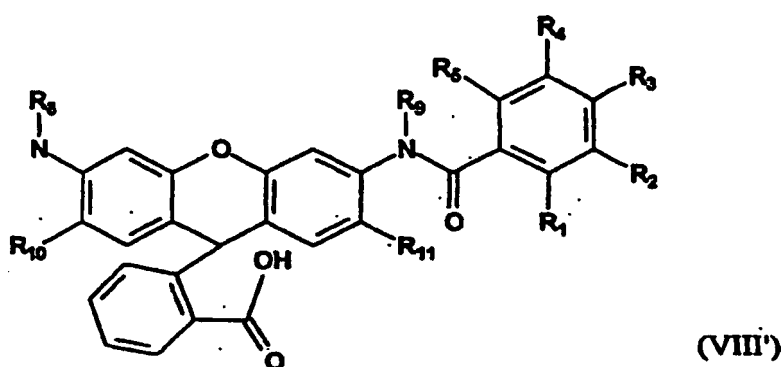
[0035] Die neuen Fluoreszenzfarbstoffe der Formel VIII sind Derivate von Rhodamin durch Einbringen einer Fluor- oder Chlorsubstituierten benzoylblockierten Gruppe in eine der zwei Aminogruppe von Rhodamin. Die HN-R₈ Gruppe in Formel VIII liefert den Ankopplungspunkt zur Reaktion mit einem potentiellen Enzymsubstrat, wie die Carboxylgruppe eines N-geschützten Peptids, um eine Peptidamidbindung zu bilden. Die Reaktion wird das Fluoreszenzmolekül von Formel VIII in ein nicht-fluoreszierendes Peptid-Reportermolekül von Formel IV oder V umwandeln, welches ein Substrat für Proteasen oder Peptidasen ist. Eine Spaltung der spaltbaren Peptid-Reporteamidbindung im Peptid-Reporter durch Proteasen oder Peptidasen produziert eine Verbindung von Formel VIID oder VIII' die fluoreszierend ist.

[0036] Insbesondere sind die neuen Fluoreszenzfarbstoffe von Formel VIII:



oder biologisch akzeptable Salze, worin R₁-R₅ wie vorher in Formel II definiert sind; R₈-R₁₁ wie vorher in Formel III definiert sind. Vorzugsweise sind drei der R₁-R₅ Fluor, besonders bevorzugt vier der R₁-R₅ sind Fluor, und besonders bevorzugt sind R₁-R₅ alle Fluor. Vorzugsweise sind R₈-R₁₁ Wasserstoff oder Alkyl. Besonders bevorzugt sind R₈-R₁₁ alle Wasserstoff.

[0037] Die Verbindungen von Formel VIII können in tautomeren Formen vorkommen, besonders die ringöffnende Form von Formel VIII'. Die tautomeren Formen umfassen, sind aber nicht limitiert auf VIII und VIII'.



[0038] Die durch Formel VI dargestellten Reporterverbindungen können verwendet werden, um die Aktivität von intrazellulären Caspasen oder anderen Enzymen, die bei der Apoptose in lebenden oder toten Zellen oder Geweben involviert sind, zu messen. Die Verbindungen, dargestellt durch Formel IV und die hierin beschriebenen Testverfahren können verwendet werden, um die Aktivierung oder Inhibierung von jeglichem der Caspase Enzyme innerhalb jeglicher lebenden oder toten Gesamtzelle oder Gewebe (normal oder kanzerogen) durch eine Testsubstanz oder Substanzen zu messen. Die Verbindungen, dargestellt durch Formel IV sind zell-permeabel, d. h. dass sie in die Gesamtzelle oder in Gewebeproben eingebracht werden können. Die Verbindungen sind fluorogen oder fluoreszierend und können so designed werden, dass sie spezifisch für jegliche der bekannten Caspasen oder für jegliche andere intrazelluläre Enzyme, die bei der Apoptose involviert sind,

sind.

[0039] Thornberry, N.A., et al., J. Biol. Chem. 272:17907 (1997) beschreibt die optimalen Sequenzen für verschiedene Caspasen Substrate und für das Granzym B Substrat. Die optimalen Substratsequenzen werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Enzym*	Optimale Sequenz**
Caspase-1 (ICE)	WEHD (SEQ ID NO: 1)
Caspase-2 (ICH-I, mNEDD2)	DEHD (SEQ ID NO:6)
Caspase-3 (apopain, CPP-32, YAMA)	DEVD (SEQ ID NO:5)
Caspase-4 (ICE _{te} -II, TX, ICH-2)	(W/L)EHD (SEQ ID NO:25)
Caspase-5 (ICE _{te} -III, TY)	(W/L)EHD (SEQ ID NO:25)
Caspase-6 (Mch2)	VEHD (SEQ ID NO:7)
Caspase-7 (Mch-3, ICE-LAP3, CMH-1)	DEVD (SEQ ID NO:5)
Caspase-8 (MACH, FLICE, Mch5)	LETD (SEQ ID NO:8)
Caspase-9 (ICE-LAP6, Mch6)	LEHD (SEQ ID NO:3)
Granzym B	IEPD (SEQ ID NO:23)

*Die Enzyme werden identifiziert durch sowohl die neue und alte (in Parenthesen) Nomenklatur

** Standard Ein-Buchstaben Abkürzungen für Aminosäuren werden verwendet, um die optimalen Aminosäuresequenzen anzugeben.

[0040] Unter Verwendung der optimalen Sequenzen, die von Thornberry et al. beschrieben werden, können fluorogene oder fluoreszierende Substrate für spezifische Caspasen synthetisiert werden durch die hierin beschriebenen Verfahren.

[0041] Es ist ebenfalls möglich, andere fluorogene oder fluoreszierende Substrate für bekannte oder unbekannte Caspasen oder andere Enzyme zu entwerfen unter Verwendung von bekannten oder potentiellen Spaltungsseiten Peptidsequenzen von bekannten oder potentiellen natürlichen Substraten von Caspasen oder anderen Enzymen. Tabelle 2 veranschaulicht Peptidsequenzen, die mit bekannten oder potentiellen Spaltungsstellen in Proteinen korrespondieren und die natürliche Substrate für Caspasen sein können.

Table 2

Enzyme	Substrate	Spaltsequenz*
Caspase- 3	PARP	DEVD (SEQ ID NO:5)
	PAK2	SHVD (SEQ ID NO: 10)
	D4-GDI	DELD (SEQ ID NO: 11)
	U1-70kDa	DGPD (SEQ ID NO:12)
	SREBP	DEPD (SEQ ID NO:13)
	DNA-PK	DEVD (SEQ ID NO:5)
	huntingtin	DGTD (SEQ ID NO: 14) DLND (SEQ ID NO: 15) DEED (SEQ ID NO: 16) DSL D (SEQ ID NO: 17)
	mdm2	DVPD (SEQ ID NO: 18)
	fodrin	DETD (SEQ ID NO:4)
Caspase- 3 + andere unbekannte Kaspasen mögliche Caspase-3 mögliche Caspase-3 ? Caspase-6 Caspase-8	Rb	DEAD (SEQ ID NO: 19)
	presenilins	DSYD (SEQ ID NO:20)
	actin	ELPD (SEQ ID NO:21)
	lamin A	VEID (SEQ ID NO:26)
	CPP32	IETD (SEQ ID NO:24)

*Standard Ein-Buchstaben Abkürzungen für Aminosäuren werden verwendet, um die Aminosäuresequenzen anzugeben.

[0042] Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate können ebenfalls ausgelegt werden, um mehr als ein Enzym zu einer Zeit zu messen, indem man Substrate herstellt, die erkannt werden und gespalten werden durch mehr als eines der Enzyme, die in der Caspasen Kaskade involviert sind. Fluorogene oder fluoreszierende Substrate die "viel versprechen" für mehr als eine Caspase können verwendet werden unter Verwendung des Testverfahrens, welches hierin beschrieben ist, um die Aktivität von bislang unbekannten Caspasen zu messen.

[0043] Wenn die Caspase Kaskade aktiviert ist durch einen Zelltod induzierenden Stimulus werden die fluorogenen oder fluoreszierenden Reportermoleküle, die hierin beschrieben sind gespalten und antworten mit einem großen Anstieg in der Fluoreszenzemission. Die Veränderung der Fluoreszenz kann fotofluorometrisch gemessen werden. Die Reportermoleküle können ebenfalls verwendet werden, um die Basislinien Caspase-Aktivität in Zellen zu messen, die keine Apoptose durchmachen. Das Verfahren kann leicht an hohen Durchsatz oder sehr hohe Durchsatz-Screeningtests angepasst werden.

[0044] Das Testverfahren ist sehr vielseitig. Beispiele der extremen Vielseitigkeit des Testsystems werden unten angegeben:

- 1) Der Test kann verwendet werden, um eine Zelle oder Gewebe für die Basislinien Aktivität von jeglichem Caspasen Enzym oder jeglichen anderen Enzymen, die bei der Apoptose involviert sind, zu messen.
- 2) Der Test kann verwendet werden mit gleicher Einfachheit, um Verbindungen zu screenen, die sowohl die Caspase Kaskade aktivieren als auch inhibieren. Das bedeutet, dass der Test verwendet werden kann um Drogen gegen degenerative Krankheiten zu screenen oder für Drogen gegen Krebs.
- 3) Das Verfahren kann verwendet werden, um die Caspase Kaskade Aktivierung oder Inhibierung in jeglichen lebenden oder toten Zellen oder Zelllinien, die abgeleitet sind von jeglichem Organsystem in dem Körper, umfassend aber nicht limitiert auf Haare, Gehirn, peripherales Nervensystem, Auge, Ohr, Nase, Mund, Zunge, Zähne, Speiseröhre, Lunge, Herz, Blut, Blutadern, Knochenmark, Lymphknoten, Thymus, Milz, Immunsystem, Leber, Magen, Darmtrakt, Bauchspeicheldrüse, endokrine Drüsen und Gewebe, Niere, Blase, reproduktive Organe und Drüsen, Gelenke, Knochen und Haut zu messen. Der Test kann verwendet werden, um Drogen zu screenen mit potentieller Verwendung bei jeglicher Krankheit von jeglichem Organsys-

tem im Körper, das eine schlechte Funktion der Caspase Kaskade umfasst.

4) Der Test kann verwendet werden, um Drogen zu screenen, die die Caspase Kaskade direkt oder indirekt modulieren, d. h. durch Modulation der Caspasen selbst oder durch Modulation von zellulären Rezeptoren und Co-Faktoren, die die Caspase Kaskade beeinflusst.

5) Der Test kann verwendet werden, um die Reaktionsstelle an der ein Caspase Kaskade Modulator interferiert, zu bestimmen. D. h., der Test kann helfen, den molekularen Mechanismus der Wirkung einer neuen Caspasen Kaskaden Modulator Droge festzustellen.

[0045] Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate, dargestellt durch Forme N werden verwendet zum Auffinden von neuen Verbindungen oder neuen Verwendungen für bekannte Verbindungen beim Reduzieren, Vorbeugen und Behandeln von Krankheiten bei denen apoptotischer Zelltod entweder ein kausaler Faktor oder ein Ergebnis ist. Beispiele von Verwendungen für die Substrate der vorliegenden Erfindung umfassen das Screening von Verbindungen, die das Nervensystem schützen können, gefolgt von fokaler Ischämie und globaler Ischämie; Screenings für Verbindungen, die neurodegenerative Störungen, wie Alzheimer, Huntington's Krankheit, Prionenkrankheit, Parkinson, Multiple Sklerose, Amyotrophische laterale Sklerose, Ataxia, Telangiktasie, und spinobulbare Atrophy behandeln; Screenings für Verbindungen, die Herzkrankheiten behandeln, umfassend myokardiale Infarkte, kongestive Herzinsuffizienz und Myocardiopathy; Screening für Verbindungen, die retinale Störungen behandeln können; Screenings für Verbindungen die Autoimmunstörungen behandeln können, einschließlich Lupus Erythematosus, rheumatische Arthritis, Typ 1 Diabetes, Sjögren's Syndrom und Glomerulonephritis; Screening für Verbindungen die polyzystische Nierenkrankheiten und Anämie/Erythropoiesis behandeln, Screening für Verbindungen die Immunsystemstörungen behandeln, einschließlich AIDS und SCIDS; Screening von Verbindungen die den Tod von Zelllinien in industrieller Biotechnologie reduzieren oder verhindern; Screening für Verbindungen die Alopezie (Haarverlust) reduzieren oder verhindern; und Screening für Verbindungen die vorzeitigen Tod von Hautzellen reduzieren.

[0046] Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate der vorliegenden Erfindung, die durch Formel IV dargestellt sind, können bei Screeningverfahren verwendet werden, wo Büchereien von bekannten Drogen oder kombinatorische oder andere Verbindungsbüchereien gescreent werden für Verbindungen mit Anti-Tumor und Anti-Krebs Aktivität. Die Krebszellen oder Zelllinien können abgeleitet werden von jeglichem Krebs oder jeglichem internen oder externen Organsystem in dem Körper umfassend aber nicht limitiert auf Gehirn, peripherales Nervensystem, Auge, Ohr, Nase, Mund, Zunge, Zähne, Speiseröhre, Lunge, Herz, Blut, Blutgefäße, Knochenmark, Lymphknoten, Thymus, Milz, Immunsystem, Leber, Magen, Darmtrakt, Bauchspeicheldrüse, endokrine Drüsen und Gewebe, Niere, Blase, reproduktive Organe und Drüsen (z. B. Prostata-drüse), Gelenke, Knochen und Haut.

[0047] Die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate, dargestellt durch Formel I können in diagnostischen Verfahren verwendet werden, um die Chemosensitivität oder Widerstandsfähigkeit von Krebszellen, die von einem Tier oder von einem Menschen stammen, der einer chemotherapeutischen Behandlung unterzogen wird, zu bestimmen. Die Krebszellen oder Zelllinien können abgeleitet werden von jeglichem Krebs von jeglichem internen oder externen Organsystem im Körper umfassend aber nicht limitiert auf Gehirn, peripherales Nervensystem, Auge, Ohr, Nase, Mund, Zunge, Zähne, Speiseröhre, Lunge, Herz, Blut, Blutadern, Knochenmark, Lymphknoten, Thymus, Milz, Immunsystem, Leber, Magen, Darmtrakt, Bauchspeicheldrüse, endokrine Drüsen und Gewebe, Niere, Blase, reproduktive Organe und Drüsen, Gelenke, Knochen und Haut.

[0048] Insbesondere können die erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden bei einem Verfahren zum Bestimmen eines Enzyms, welches in der Apoptose Kaskade in einer oder in mehreren Zellen involviert ist, umfassend:

- (a) Kontaktieren der einen oder mehreren Zellen mit einer Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Reporterverbindung in die oder mehrere Zellen aufgenommen wird, und
- (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der einen oder mehreren Zellen, wobei eine Fluoreszenzveränderung sowohl der Größe als auch der Wellenlänge innerhalb der einen oder mehreren Zellen, verglichen mit Kontrollzellen, die nicht so kontaktiert wurden oder die mit der Reporterverbindung kontaktiert wurden und einem bekannten kompetitiven Inhibitor des Enzyms eine Indikation des Vorhandenseins des Enzyms ist.

[0049] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können ebenfalls in einem Verfahren zum Messen der Aktivität eines Enzyms verwendet werden, welches in der Apoptose Kaskade in einer oder mehreren Zellen involviert ist, umfassend

- (a) Kontaktieren der einen oder mehreren Zellen mit einer Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Reporterverbindung in eine oder mehrere Zellen aufgenommen wird, und
- (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der einen oder mehreren Zellen, wodurch die relative Veränderung der

Fluoreszenz sowohl des Ausmaßes als auch der Wellenlänge innerhalb der einen oder mehreren Zellen, verglichen mit Kontrollzellen, die nicht so kontaktiert wurden, oder die mit der Reporterverbindung und einem bekannten kompetitiven Inhibitor des Enzyms behandelt wurden, ist eine Messung der Aktivität des Enzyms.

[0050] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können ebenfalls in einem Verfahren verwendet werden, um zu bestimmen, ob eine Testsubstanz einen Effekt auf ein Enzym hat, welches in der Apoptose Kaskade in einem oder mehreren Testzellen involviert ist, umfassend

(a) Kontaktieren der einen oder mehreren Testzellen mit der Testsubstanz und der Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Reporterverbindung in eine oder mehrere Zellen aufgenommen wird und die Testsubstanz entweder mit einem externen Membranrezeptor interagiert oder in die Zellen aufgenommen wird und

(b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Testzellen, wobei eine Veränderung der Fluoreszenz sowohl im Ausmaß als auch der Wellenlänge innerhalb der Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, die nicht kontaktiert worden sind mit der Reporterverbindung und nicht mit der Testsubstanz, eine Anzeige dafür ist, dass die Testsubstanz einen Effekt entweder direkt oder indirekt auf das zu testende Apoptose Enzym hat.

[0051] In der Praxis dieses Verfahrens können die Testzellen mit der Testsubstanz vor oder nachher oder im wesentlichen gleichzeitig mit der Reporterverbindung gemäß der Erfindung kontaktiert werden. Das Verfahren kann entweder verwendet werden, um festzustellen, ob die Testsubstanz die Aktivität des Enzyms stimuliert oder inhibiert.

[0052] Das Verfahren kann ebenfalls das Kontaktieren der Testzellen mit einer zweiten Testsubstanz oder einem Gemisch von Testsubstanzen in der Gegenwart der ersten Testsubstanz einschließen.

[0053] Die Testzelle kann eine Krebszelle oder eine Zelllinie sein, abgeleitet von einem Menschen, der eine Behandlung mit einer chemotherapeutischen Droge benötigt und die Testsubstanz ist ein chemotherapeutisches Mittel oder ein Gemisch eines chemotherapeutischen Mittels.

[0054] Die Verbindungen der Erfindung können ebenfalls verwendet werden, um die Sensitivität eines Tieres mit Krebs auf die Behandlung mit einem oder mehreren chemotherapeutischen Mitteln zu bestimmen, umfassend

(a) Kontaktieren von Krebszellen, die von dem Tier genommen wurden, mit einem oder mehreren chemotherapeutischen Mitteln und der Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Reporterverbindung in die Krebszellen aufgenommen wird und das eine oder mehrere Mittel sowohl mit einem externen Zellmembranrezeptor der Zelle interagiert oder in die Zelle aufgenommen wird, und

(b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Krebszellen, wodurch ein Wechsel der Fluoreszenz sowohl im Ausmaß oder der Wellenlänge innerhalb der Krebszellen, verglichen mit Kontrollzellen, die nicht mit der Reporterverbindung kontaktiert worden sind, verglichen mit Kontrollzellen, eine Anzeige ist, dass die Krebszellen gegenüber einem oder mehreren Mitteln chemosensitiv sind und dass das Tier sensitiv gegenüber der Behandlung ist.

[0055] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können ebenfalls in einem Verfahren zum Beobachten der Behandlung eines Tieres mit einem oder mehreren chemotherapeutischen Drogen verwendet werden, umfassend

(a) Verabreichen von ein oder mehreren chemotherapeutischen Drogen dem Tier,

(b) Kontaktieren von Zellen, die von dem Tier genommen wurden, die mit der Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Reporterverbindung in die Zelle aufgenommen wird und

(c) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Zellen, die mit der Reporterverbindung kontaktiert worden sind, wodurch ein Wechsel der Fluoreszenz sowohl im Ausmaß als auch der Wellenlänge innerhalb der Zellen, die von dem Tier genommen worden sind nach der Behandlung, verglichen mit Kontrollzellen, die von dem Tier vor der Behandlung genommen worden sind, eine Anzeige ist, dass das Tier sensitiv gegenüber dem chemotherapeutischen Mittel ist. Das Tier kann ebenfalls unter einer Krankheit leiden, bei der apoptotischer Zelltod entweder ein kausaler Faktor oder ein Ergebnis ist.

[0056] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können ebenfalls in einem Verfahren zum Bestimmen verwendet werden, bei dem eine Testsubstanz Zelltod in einer oder mehreren Testzellen inhibiert oder davor schützt, umfassend

(a) Kontaktieren der Testzelle mit der Testsubstanz und der Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Testsubstanz entweder mit einem externen Membranrezeptor interagiert oder

in die Zelle aufgenommen wird und die Reporter Verbindung in die Zelle aufgenommen wird und
 (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Testzellen, wodurch eine Veränderung der Fluoreszenz sowohl des Ausmaßes als auch der Wellenlänge innerhalb der Testzellen, verglichen mit Testzellen, die nur mit der Reporter Verbindung kontaktiert worden sind, eine Indikation ist, dass die Testsubstanz Zelltod inhibiert oder davor schützt.

[0057] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können für ein Verfahren zum Bestimmen verwendet werden, bei dem eine Testsubstanz Zelltod in einer oder mehreren Testzellen verursacht oder verstärkt, umfassend die Schritte

- (a) Kontaktieren der Testzellen mit der Testsubstanz und der Reporter Verbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Testsubstanz entweder mit einem externen Membranrezeptor interagiert oder in die Zellen aufgenommen wird und die Reporter Verbindung in die Zellen aufgenommen wird,
- (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Testzellen, wodurch ein Wechsel der Fluoreszenz entweder im Ausmaß oder der Wellenlänge innerhalb der Testzellen, verglichen mit Kontrollzellen, die nur mit der Reporter Verbindung kontaktiert worden sind, eine Anzeige ist, dass die Testsubstanz Zelltod verursacht oder verstärkt.

[0058] Die Reporter Verbindungen dargestellt durch Formel V können verwendet werden, um die Aktivität von zellulären Peptidasen und Proteasen in lebenden Gesamtzellen zu messen, umfassend aber nicht limitiert auf Typ 2 Methionin Aminopeptidase in endothelialen Zellen und HIV Proteasen in HIV infizierten Zellen. Die Verbindungen, dargestellt durch Formel V und die Testverfahren, die hierin beschrieben sind können verwendet werden, um die Inhibierung von Enzymen innerhalb der lebenden Gesamtzelle zu messen, mittels einer Testverbindung oder Verbindungen. Die Reporter Verbindungen dargestellt durch Formel V sind zellpermeabel, d. h. dass sie in die Gesamtzelle eingebracht werden können. Die Verbindungen sind fluorogen oder fluoreszierend und können so ausgelegt werden, dass sie spezifisch sind für die bekannten Enzyme, die von Interesse sind, wie die Methionin-Aminopeptidase oder HIV Protease.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0059] [Fig. 1](#) beschreibt ein Schaubild, welches die Fluoreszenz von N-Pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (R110-PFB) verglichen mit Rhodamin 110 (R110) zeigt.

[0060] Die [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) beschreiben Fotografien, die das Anfärben von Zellen mit N-Pentafluorbenzoyl-R110 (2B), verglichen mit R110 (2A), zeigen.

[0061] [Fig. 3](#) beschreibt eine Strichzeichnung, die die Spaltung von N-Gly-R 110 PFB und N-Cbz-Gly-R110-PFB durch HL-60 Zelllysate zeigt.

[0062] Die [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) beschreiben Fotografien, die das Anfärben HL-60 Zellen mit N-Gly-R 110 PFB (4A), verglichen mit N-Cbz-Gly-R110-PFB (4B) zeigen.

[0063] [Fig. 5](#) beschreibt ein Schaubild, welches die Spaltung von N-Z-DEVD-R110-PFB (SEQ ID NO:5) durch rCaspase-3 und HL-60 Lysaten, zeigt.

[0064] [Fig. 6](#) beschreibt eine Strichzeichnung mit dem Ergebnis eines Spaltungstests von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) durch rekombinante Kaspase-3.

[0065] [Fig. 7](#) beschreibt ein Schaubild, welches die Spaltung von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) in staurosporin induzierten apoptotischen Zellen zeigt.

[0066] [Fig. 8](#) zeigt ein Schaubild, welches die Spaltung von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) in Anti-Fas antikörperinduzierten apoptotischen Zellen zeigt.

[0067] [Fig. 9](#) zeigt ein Schaubild, welches die Spaltung von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) in staurosporin induzierten apoptotischen Zellen und ihre Inhibierung durch einen Pan-Caspase Inhibitor zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0068] Die vorliegende Erfindung betrifft fluorogene oder fluoreszierende Substrate mit der allgemeinen Formel I:

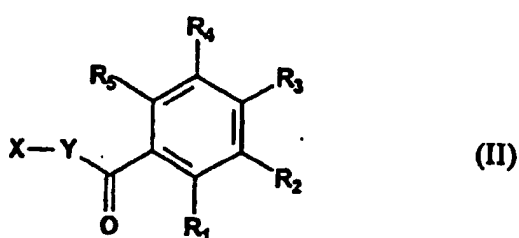
X-Y-Z

(I)

oder biologisch akzeptable Salze oder Pro-Reportermoleküle (wie Methylesterform von Carboxylenthaltenden Aminosäureresten) davon, worin X ein Peptid, einer Aminosäure oder eine andere Struktur ist, der Art, dass die Verbindungen von Formel I ein Substrat für eine Caspase oder andere Proteasen oder Peptidasen oder andere Enzyme ist; und worin X-Y eine spaltbare Bindung ist. Y eine fluorogene oder fluoreszierende Hälfte ist, vorzugsweise ein Rhodamin, umfassend aber nicht limitiert auf Rhodamin 110, Rhodamin 116, Rhodamin 19 und Sulfonrhodamin und besonders bevorzugt Rhodamin 110. Z ist ein Halogen substituierte benzoylblo-ckierte Gruppe und die Y-Z Bindung ist keine spaltbare Bindung. Vorzugsweise ist Z eine multi-fluorsubstituierte Benzoylgruppe und besonders bevorzugt ist Z eine Tetrafluor oder Pentafluorbenzoylgruppe.

[0069] Die Verbindungen, die unter den Bereich von Formel I fallen, umfassen Verbindungen, worin die erste Aminogruppe, die an Y angebracht ist ein Asp ist. X kann ein N-blockiertes Tetrapeptidsubstrat einer Caspase sein, umfassend WEHD SEQ ID NO: 1, YVAD SEQ ID NO:2, LEHD SEQ ID NO:3, DETD SEQ ID NO:4, DEVD SEQ ID NO:5, DEHD SEQ ID NO:6, VEHD SEQ ID NO:7, LETD SEQ ID NO:8, SHVD SEQ ID NO:10, DELD SEQ ID NO:11, DGPD SEQ ID NO:12, DEPD SEQ ID NO:13, DGTD SEQ ID NO:14, DLND SEQ ID NO:15, DEED SEQ ID NO:16, DSLD SEQ ID NO:17, DVPD SEQ ID NO:18, DEAD SEQ ID NO: 19, DSYD SEQ ID NO:20, ELPD SEQ ID NO:21, VEID SEQ ID NO:26, IETD SEQ ID NO:24, oder ein N-blockiertes Tetrapeptid-substrat von Granzym B umfassend IEPD SEQ ID NO:23 und VEPD SEQ ID NO:27; oder X kann ein N-blo-ckiertes Peptid sein, welches mit einem carboxylterminierten oder aminotermierten Fragment korrespondiert, bestehend aus 1, 2 oder 3 Aminosäuren des Tetrapeptidsubstrats einer Caspase, umfassend WEHD SEQ ID NO:1, YVAD SEQ ID NO:2, LEHD SEQ ID NO:3, DETD SEQ ID NO:4, DEVD SEQ ID NO:5, DEHD SEQ ID NO:6, VEHD SEQ ID NO:7, LETD SEQ ID NO:8, SHVD SEQ ID NO:10, DELD SEQ ID NO:11, DGPD SEQ ID NO:12, DEPD SEQ ID NO:13, DGTD SEQ ID NO:14, DLND SEQ ID NO:15, DEED SEQ ID NO:16, DSLD SEQ ID NO:17, DVPD SEQ ID NO:18, DEAD SEQ ID NO:19, DSYD SEQ ID NO:20, ELPD SEQ ID NO:21, VEID SEQ ID NO:26, IETD SEQ ID NO:24 und Granzym B umfassend IEPD SEQ ID NO:23 und VEPD SEQ ID NO:27; oder X kann ein N-blockiertes Peptid sein, welches mit einem carboxylterminierten oder aminotermierten Fragment korrespondiert, bestehend aus 1, 2, 3 oder 4 Aminosäuren eines Tetrapeptidsubstrats einer Caspase umfassend WEHD SEQ ID NO:1, YVAD SEQ ID NO:2, LEHD SEQ ID NO:3, DETD SEQ ID NO:4, DEVD SEQ ID NO:5, DEHD SEQ ID NO:6, VEHD SEQ ID NO:7, LETD SEQ ID NO:8, SHVD SEQ ID NO:10, DELD SEQ ID NO:11, DGPD SEQ ID NO:12, DEPD SEQ ID NO:13, DGTD SEQ ID NO:14, DLND SEQ ID NO:15, DEED SEQ ID NO:16, DSLD SEQ ID NO:17, DVPD SEQ ID NO:18, DEAD SEQ ID NO:19, DSYD SEQ ID NO:20, ELPD SEQ ID NO:21, VEID SEQ ID NO:26, IETD SEQ ID NO:24 und Granzym B umfassend IEPD SEQ ID NO: 23 und VEPD SEQ ID NO:27, plus 1-2 Aminosäuren korrespondieren mit dem P₁'-P₂' Abschnitt des Substrats einer Caspase, umfassend G, A, GA, GG und AG.

[0070] Gemäß einem ersten Aspekt der Erfindung werden daher Verbindungen geschaffen, die durch die For-mel II dargestellt werden:



oder biologisch akzeptabel Salze davon oder Pro-Reportermoleküle davon, worin X ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureestern und einem Peptid und Y ist eine fluoreszierende Hälfte, z. B. Rho-damin 110.

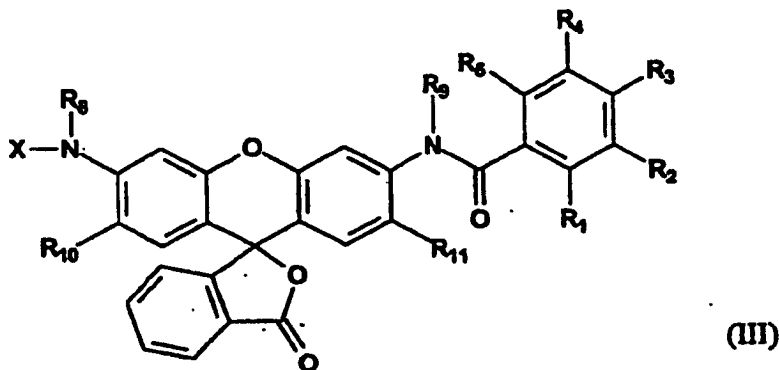
[0071] R₁-R₅ sind unabhängig Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Haloalkyl, Aryl, Cycloalkyl, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Aralkyl, Aralkenyl, Arylalkynyl, Hydroxyalkyl, Nitro, Amino, Cyano, Acylamino, Acyl, Hydroxy, Acyloxy, Alkoxy, Alkylthio, oder Carboxy; mit der Maßgabe, dass wenigstens einer von R₁, R₃ oder R₅ Fluor oder Chlor ist. Vorzugsweise sind drei von R₁-R₅ Fluor, besonders bevorzugt vier der R₁-R₅ sind Fluor, und ganz beson-ders bevorzugt sind R₁-R₅ alle Fluor.

[0072] In bestimmten Ausführungsformen ist X ein Substrat für ein Caspase Enzym.

[0073] In derartigen Ausführungsformen kann X ein N-blockiertes Peptid sein, bestehend aus C-terminaler Asp und wenigstens einer Aminosäure aus einer Peptidkette, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEVD (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO:19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26), IETD (SEQ ID NO:24), IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27).

[0074] Besonders bevorzugte Ausführungsformen sind dargestellt durch die folgende Formel III:



oder biologisch akzeptable Salze oder Pro-Reportermoleküle davon, worin X und R₁-R₅ wie oben in den Formeln I und II definiert sind; und R₈ und R₉ die gleichen oder unterschiedlich sind und unabhängig Wasserstoff, Alkyl oder Aryl voneinander sind; und R₁₀ und R₁₁ gleich oder unterschiedlich sind und unabhängig voneinander Wasserstoff oder Alkyl sind.

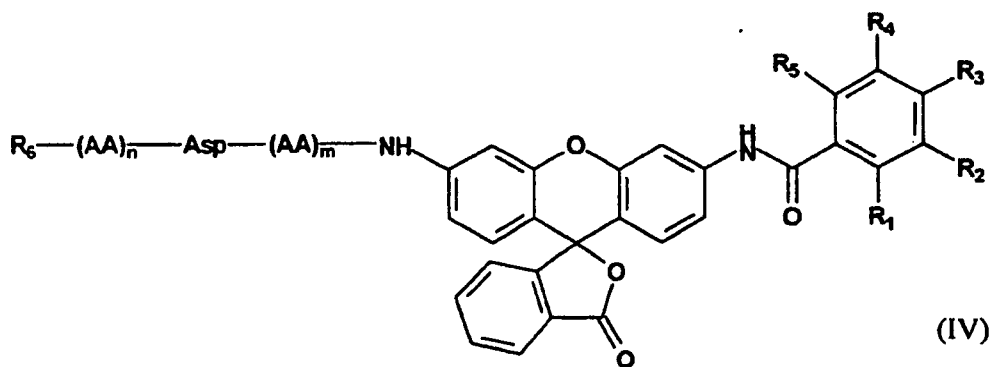
[0075] In bestimmten Ausführungsformen ist X ein Substrat für ein Caspase Enzym. In derartigen Ausführungsformen kann X ein N-blockiertes Peptid sein, bestehend aus C-terminaler Asp und wenigstens einer Aminosäure eines Peptidkette ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEVD (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO:19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26), IETD (SEQ ID NO:24), IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27) oder X kann ein Substrat für Granzym B sein.

[0076] X kann ein N-blockiertes Tetrapeptid sein, bestehend aus IEPD (SEQ ID NO: 23) oder VEPD (SEQ ID NO: 27).

[0077] Jeder von R₁-R₅ kann Fluor sein. Bevorzugt sind R₈ und R₉ Wasserstoff, Methyl oder Ethyl und R₁₀ und R₁₁ sind Wasserstoff oder Methyl. Besonders bevorzugt sind R₈ und R₁₁ Wasserstoff. In bestimmten Ausführungsformen kann jeder von R₈ bis R₁₁ Wasserstoff sein.

[0078] Die Fluor oder Chlor substituierte Benzoylgruppe in Formel III ist eingebracht, um eine der zwei Aminogruppen in einem Rhodamin zu blockieren. Die verbleibende HNR₈ Gruppe ist ausgewählt zur Reaktion mit einem potentiellen Enzym Substrat X, um ein fluorogenes Substrat der Formel III zu ergeben. Durch blockieren von einer der zwei Aminogruppen in einem Rhodamin ist die gesamte Größe des Substrats reduziert, verglichen mit einem Bissubstituierten-Rhodamin wie einem Bis-Peptid-Rhodamin. Es ist sehr wichtig, dass die fluor- oder chloresubstituierte Benzoylgruppe ebenfalls die Lipophilität des Moleküls steigert, so dass die Zellpermeabilität der Substrate von Formel III gesteigert werden. Ergänzend aktiviert das Vorhandensein der Carbonylgruppe zusammen mit einer anderen Elektronen ziehenden Gruppe, die in der Benzoylgruppe vorhanden ist, den Ring, so dass die Fluor- oder Chlorgruppen im Ring ausgetauscht werden können durch ein Nukleophil innerhalb der Zelle, wie eine Thiol-, Amino- oder Hydroxylgruppe aus Proteinen oder Peptiden. Dies wird in einer Akkumulation der Substrate innerhalb der Zelle resultieren als auch in einer Retention der Fluoreszenzhälfte des Substrats innerhalb der Zelle nach Spalten der X-N Bindung in Formel II durch die Zielenzyme. Weiterhin resultiert der Austausch der Fluor- oder Chlorgruppe durch ein Nukleophil ebenfalls in dem Austausch der Elektronen abziehenden Fluor- oder Chlorgruppe durch eine Elektronen abgebende Gruppe wie Sulfid, Amino oder Ether oder dem Ersatz der Fluor- oder Chlorgruppe durch eine hochhydrophile Hälfte wie Glutathion, welches die Fluoreszenzintensität oder Wellenlänge der fluorogenen oder fluoreszierenden Hälfte der Substrate ändern kann.

[0079] Insbesondere ist eine Klasse der neuen fluorogenen oder fluoreszierenden Reporterverbindungen der Erfindung diejenige von Formel IV:



oder biologisch akzeptable Salze oder Pro-Reportermoleküle davon, worin R_1 - R_5 wie vorher in Formel II definiert sind; und R_6 eine N-terminale Schutzgruppe, wie z. B. t-Butyloxycarbonyl, Acyl, Benzyloxycarbonyl und Pentafluorbenzoyl ist; jedes AA unabhängig von jeglicher natürlicher oder nicht natürlicher Aminosäure ist, n ist 0 bis 5 und m ist von 0 bis 3.

[0080] Vorzugsweise ist R_6 t-Butyloxycarbonyl, Benzyloxycarbonyl, Acetyl, Octanoyl, Dodecanoyl oder Pentafluorbenzoyl.

[0081] Bevorzugte Ausführungsformen der Verbindungen von Formel IV sind diejenigen:

worin $n = 3$ und das $(AA)_n$ -Asp ein Mitglied ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEVD (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO: 19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26) und IETD (SEQ ID NO:24);

worin R_6 -(AA)_n-Asp ein N-blockiertes Peptid ist, bestehend aus C-terminalem Asp und wenigstens einer Aminosäure der auf einer Peptidkette, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEVD (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO: 19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26) und IETD (SEQ ID NO:24), IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27);

worin $n = 3$ und das $(AA)_n$ -Asp ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27);

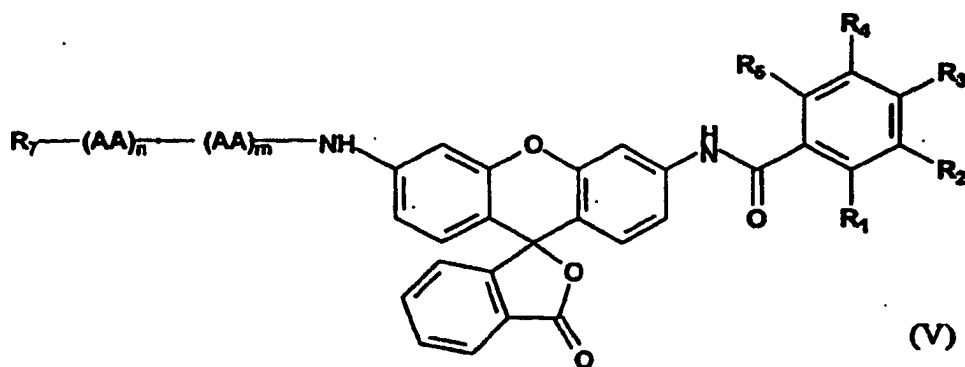
worin $m = 2$ und AA ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus G und A; oder worin wenigstens einer der R_1 - R_5 Fluor ist.

[0082] Verbindungen der Formel IV sind neue fluorogene oder fluoreszierende Substrate für Caspasen oder andere Enzyme, die sich auf Apoptose beziehen. Wenn m 0 ist, wird die Spaltung der Amidbindung zwischen Asp und Rhodamin das fluorogene Substrat in den Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIII umwandeln. Wenn m nicht 0 ist, wird die Spaltung der Amidbindung zwischen Asp und $(AA)_m$ das Rhodamin angebracht an NH_2 -(AA)_m verlassen. Die verbleibenden Aminosäuren $(AA)_m$ werden dann durch Aminopeptidasen entfernt, die in der Zelle anwesend sind, um den Fluoreszenzfarbstoff von Formel VIII zu ergeben. $(AA)_m$ kann so ausgeführt sein, dass es mit der P' Sequenz der Spaltungsseite der Substrate von Caspasen oder Apoptosen bezogenen Enzymen korrespondiert. Es wird angenommen, dass der Einbau der P' Sequenz von bekannten Substraten von Caspasen oder Apoptosen bezogenen Enzymen die Spezifität und Affinität der fluorogenen Substrate erhöht. Da Aminopeptidasen sehr weitläufig in Zellen vorhanden sind, kann man eine $(AA)_m$ Sequenz bei dem Design von Substraten von Formel N für Gesamtzelltests einfügen. Dies ist ein anderer Vorteil von Gesamtzelltests gegenüber Gesamtzellen-Enzymtests. Zum Beispiel, wenn $(AA)_m$ Gly ist, ein Substrat der Formel N wird in Gesamtzelltest funktionieren, aber demgegenüber wird es nicht in zellfreien Caspasetests funktionieren, da die Spaltung von Asp-Gly Aminobindung das Gly, angebracht an dem Rhodamin verlassen wird, welches nicht fluoresziert.

[0083] Ein Beispiel eines Pro-Reportermoleküls ist eine Methyl- oder ein Ethylesterform von carboxylenthal-

tenden Aminosäureresten, enthaltend Verbindungen von Formel IV. Ein anderes Beispiel eines Pro-Reporter-moleküls ist der Acetoxymethyl (AM) oder Pivaloyloxymethyl (PM) Ester von carboxylenthaltenden Aminosäureresten von Verbindungen von Formel IV. AM Ester von carboxylenthaltenden Verbindungen sind bekannt, dass sie zellpermeabel sind und durch Esterasen innerhalb der Zelle hydrolysiert werden können. Sobald sie hydrolysiert sind, werden die carboxylenthaltenden Verbindungen impermeable werden und werden innerhalb der Zelle gefangen werden (Adams et al., J. Am. Chem. Soc. 111 :7957-7968 (1989)). AM Ester können hergestellt werden durch die Reaktion der korrespondierenden carboxylenthaltenden Verbindungen mit Bromethylacetat.

[0084] Eine andere Klasse der neuen fluorogenen oder fluoreszierenden Reporterverbindungen der Erfindung sind die von Formel V:



oder biologisch akzeptable Salze oder Pro-Reporter-moleküle davon, worin:

R_1 - R_5 und AA, sind wie oben in den Formeln ID und N definiert; n ist 0 bis 5, z. B. 1 bis 5; m ist 0-3; R_7 ist ein groß H; oder R_7 ist ein N-terminale Schutzgruppe, vorzugsweise t-Butyloxycarbonyl, Acyl, Acetyl, Octanoyl, Dodecanoyl, Benzyloxycarbonyl oder Pentafluorbenzoyl. Vorzugsweise wenigstens eine von R_1 - R_5 sind Fluor.

[0085] In Formel V, $(AA)_n$ ist so angelegt, dass es eine Aminosäure oder ein Peptid ist, welches durch eine spezifische Peptidase oder Protease bekannt wird als die Sequenz in der p Seite und sie wird gespalten werden durch die Zielpeptidase oder Protease. $(AA)_m$ ist so ausgewählt, dass es eine Aminosäure oder ein Peptid ist, welches erkannt wird durch eine spezifische Peptidase oder Protease als die Sequenz in der P' Seite, und die entfernt werden kann durch die Aminopeptidasen, die in der Zelle vorhanden sind. Wenn R_7 eine N-terminale Schutzgruppe ist wie ein t-Butyloxycarbonyl, Cbz oder Acetyl, Verbindungen der Formel V oder Substrate für Endopeptidasen wie Cathepsin D oder Proteasen wie HIV Proteasen; wenn R_7 H ist, Verbindungen von Formel V Substrate für Exopeptidasen wie Methioninaminopeptidasen sind.

[0086] Spezifisch können Verbindungen von Formel V so ausgelegt werden, dass sich Substrate des Typs 2 Methioninaminopeptidase (MetAP-2) sind. MetAP-2 wurde kürzlich durch zwei Forschergruppen entdeckt (Griffith, E.C., et al., Chem. Biol. 4:461-471 (1997) and Sin, N., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:6099-6103 (1997)) so dass sie der allgemeine Target von angiogenese Inhibitor AGM-1470, sind, einer Anti-Krebs Droge, da es die Proteinsynthese reguliert durch Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von eIF-2. Von AGM-1470 wird berichtet, dass es nicht nur die Aminopeptidaseaktivität von MetAP-2 hemmt und keinen Effekt auf die regulatorische Aktivität von MetAP-2 hat (Griffith, E.C., et al., Chem. Biol. 4:461-471 (1997)). Da Angiogenese Inhibitor wie z. B. AGM-1470 bekannt ist, dass er geeignet ist selektive Krebszellen zu töten, wird von MetAP-2 Inhibitoren erwartet, dass sie antiangiogenetische Eigenschaften haben und potentielle neue Anti-Krebs Mittel sind.

[0087] MetAP-2 ist ein Kobalt-abhängiges Enzym, das das aminoterminal Methionin aus bestimmten Proteinen hydrolysiert. Seine bevorzugten Substrate sind Met-X-Y. X ist eine Aminosäure mit kleiner oder ungela-dener Seitengruppe, wie Gly, Ala, Ser, Leu, Met, Arg und Tyr sind bekannt, dass sie in inaktiven Substraten resultieren. Y kann Ser, Met, Gly oder andere Aminosäuren sein ((Li, X. & Chang Y.-H., Biochem. Biophys. Res. Com. 227:152-159 (1996)). Da Rhodamin größer als eine Aminosäure ist, wird eine Verbindung mit Methionin, direkt an Rhodamin angebracht, wahrscheinlich kein Substrat für MetAP-2 sein. Indem man den Vorteil des Vorhandenseins von Aminopeptidase in Gesamtzellen nimmt, kann der Einbau $(AA)_m$ Sequenz zwischen Methionin und Rhodamin ein gutes Substrat für MetAP-2 darstellen. Es wird erwartet, dass dieser Typ von Substrat in einem Gesamtzelltest gut arbeiten wird, andererseits wird er nicht in einem zellfreien MetAP-2 Test arbeiten.

[0088] Für Verbindungen der Formel V, welche dafür ausgerichtet sind, Substrate von MetAP-2 zu sein, ist R_7

H, vorzugsweise (AA)_n ist Met und vorzugsweise (AA)_m ist Gly, Ala, Gly-Gly, Ala-Gly oder Gly-Ala. Das Methionin wird gespalten durch Typ 2 Methioninaminopeptidase in endothelialen Zellen, um das Rhodamin, angebracht an (AA)_m zu ergeben. Amino-peptidasen, vorhanden im inneren der Zellen, werden dann das (AA)_m entfernen, um den Fluoreszenzfarbstoff der Formel VI zu ergeben. Verbindungen der Formel V können verwendet werden für das Screening von Inhibitoren von MetAP-2 in endothelialen Zellen, wovon erwartet wird, dass dies zur Identifikation von neuen Anti-Krebs Drogen führt.

[0089] Verbindungen der Formel V können so ausgelegt werden, dass sie Substrate von HIV Proteasen sind. HIV Protease ist eine aspartische Protease mit Prozesspolypeptiden, transkribiert von den gag und pol Genen und sie ist essentiell für die Entwicklung von antiinfektiösem Virus. Daher ist die HIV Protease eine der hauptsächlichen Ziele für die chemotherapeutische Intervention von HIV. Kürzlich wurde gezeigt dass verschiedene HIV Proteasen Inhibitoren großes Potential bei der Behandlung von HIV haben und sie daher zum Marketing zugelassen wurden. Viele der HIV Proteasen Inhibitoren wurden so ausgelegt, dass sie auf der Struktur der Substrate der Proteasen basieren. Daher sind diese Verbindungen entweder Peptide oder Peptidomethica. Es wird erwartet, dass die Suche nach neuen HIV Protease Inhibitoren weitere effektivere Drogen für den Kampf gegen diese tödliche Krankheit liefern wird.

[0090] Die bevorzugten Substrate von HIV Proteasen sind Peptide mit einer trennbaren hydrophobenhydrophoben oder aromatischen-prolin Peptidbindung zwischen den P₁-P₁' (West, M.L., and Fairlie, D.P., *Trand. Pharm. Sci.* 16:67-74 (1995)). Neun verschiedene Seiten in den viralen gag und gag-pol Proteinen wurden gefunden, die durch Proteasen gespalten werden können (Martin, J.A., et al., *Prog. Med Chem.* 32:239-287 (1995)). Die P₄-P₃' Sequenzen dieser neuen Seiten sind Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val SEQ ID NO:28, Ala-Arg-Val-Leu-Ala-Glu-Ala SEQ ID NO:29, Ala-Thr-Ile-Met-Met-Gln-Arg SEQ ID NO:30, Arg-Gln-Ala-Asn-Phe-Leu-Gly SEQ ID NO:31, Pro-Gly-Asn-Phe-Leu-Gln-Ser SEQ ID NO:32, Ser-Phe-Ser-Phe-Pro-Gln-Ile SEQ ID NO:33, Thr-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-Ser SEQ ID NO:34, Ala-Glu-Thr-Phe-Tyr-Val-Asp SEQ ID NO:35 und Arg-Lys-Val-Leu-Phe-Leu-Asp SEQ ID NO:36. Viele fluorogene, radioaktive oder chromogene Substanzen von HIV Proteasen wurden hergestellt, basierend auf diesen natürlichen Substraten für HIV Proteasenaktivitätstests. Ein intramolekulares gequenchtes fluorogenes Substrat, 2-Aminobenzoyl-Thr-Ile-Nle-(4-NO₂-Phe)-Gln-Arg-NH₂ SEQ ID NO:79, worin die spaltbare Bindung das Nle-(4-NO₂-Phe) ist, wurde hergestellt aufgrund des p24/p15 Spaltungsseiten abgeleiteten Hexapeptidsubstrats (Toth, M.V., and Marshall, G.R., *Int. J. Pept. Protein Res.* 36:544-550 (1990)). Ein fluorometrischer Test für HIV Proteasen Aktivität unter Verwendung von HPLC mit dem Substrat N-Dns-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val SEQ ID NO:28 wurde von Tamburini et al. berichtet (Tamburini, P.P., et al., *Anal. Biochem.* 186:363-368 (1990)), worin die Tyr-Pro die trennbare Bindung ist. Viele andere Proteasensubstrate, die die Sequenzen von sowohl der P und P' Seite der Spaltungsseite von HIV Proteasensubstrate einschließen, wurden entwickelt und diese umfassen das fluorogene N-alpha-benzoyl-Arg-Gly-Phe-Pro-MeO-betanaphthylamid SEQ ID NO:37, die die Phe-Pho Dipeptidbindung enthält, erkannt durch HIV-1 Protease (Tyagi, S.C., and Carter, C.A., *Anal. Biochem.* 200:143-148 (1992)); das radiomarkierte Heptapeptidsubstrat [tyrosyl-3,5-³H]Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂ SEQ ID NO:38, die basiert auf der p17-p24 Spaltungsseite Tyr-Pro, welches in dem viralen Polyproteinsubstrat Pr55gag gefunden wurde (Hyland, L.J., et al., *Anal. Biochem.* 188:408-415 (1990)); das Angiotensin I basierende Peptid Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Glu-Glu-Ser SEQ ID NO:39, welches Angiotensin I (Ang I) und Leu-Glu-Glu-Ser SEQ ID NO:40 ergibt (Evans, D.B., et al., *Anal. Biochem.* 206:288-292 (1992)); das intramolekulare Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Substrat 4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoesäure (DABCYL)-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-S-[(2-aminoethyl)amino]naphthalen-1-sulfonsäure (EDANS) SEQ ID NO:41, worin Tyr-Pro die Spaltungsseite (Matayoshi, E.D., et al., *Science* 247:954-958 (1990)); und das chromophore Peptidsubstrat H-Ser-Gln-Asn-Leu-Phe(NO₂)-Leu-Asp-Gly-NH₂ SEQ ID NO:42 und Acetyl-Arg-Lys-Ile-Leu-Phe(NO₂)-Leu-Asp-Gly-NH₂ SEQ ID NO:43, worin die Amidbindung zwischen dem para-nitrophenylalanyl und Leucinrest die spaltbare Bindung ist. Weiterhin ist das chromogene Substrat, Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe(NO₂)-Glu-Ala-Met SEQ ID NO:44, worin die Leu-Phe(NO₂) die Spaltungsseite ist, wurde berichtet von (Richards, A.D., et al., *J.Biol. Chem.* 265:7733-7736 (1990)). SAR Studien haben herausgefunden, dass die Substitution des Leurests in P1 mit Norleucin, Met, Phe oder Tyr minimale Effekte auf die kinetischen Parameter (K_{cat} und K_{cat}/K_m) aufweist, wie bestimmt wurde bei verschiedenen pH Werten, wohingegen gefunden wurde, dass Peptide, die Ile oder Val in P1 enthalten, sehr langsam hydrolysieren. Indem man das Vorhandensein von nichtspezifischen Amino-peptidasen in der Gesamtzelle als Vorteil nimmt, können fluorogene oder fluoreszierende Substrate für HIV Proteasen von Formel V so ausgelegt werden, dass die Aminosäuren von sowohl der P Seite als auch der P' Seite von HIV Substraten zur Anwendung in Gesamtzelltests enthalten. Es wird erwartet, dass nachdem die Peptidsequenz auf der P Seite gespalten ist durch die HIV Protease, dass die Peptidsequenz auf der P' Seite entfernt wird durch die in der Zelle vorhandenen Amino-peptidasen.

[0091] Für Verbindungen von Formel V, ausgelegt als Substrate von HIV Proteasen, ist bevorzugt R_7 Acetyl oder Cbz, bevorzugt $(AA)_n$ ist Thr-Ile-Nle, und bevorzugt ist $(AA)_m$ Phe-Gln-Arg, Phe-Gln oder Phe; oder bevorzugt $(AA)_n$ ist Ser-Leu-Asn-Phe SEQ ID NO: 54 oder Leu-Asn-Phe und bevorzugt $(AA)_m$ ist Pro-Ile-Val, Pro-Ile oder Pro; oder bevorzugt $(AA)_m$ ist Ser-Gln-Asn-Tyr SEQ ID NO: 45, oder Gln-Asn-Tyr und bevorzugt ist $(AA)_m$ Pro-Ile-Val-Gln SEQ ID NO: 46, Pro-Ile-Val, Pro-Val-Val-NH₂, Pro-Val-NH₂, Pro-Ile, oder Pro; oder bevorzugt $(AA)_n$ ist Arg-Gly-Phe, und bevorzugt $(AA)_m$ ist Pro; oder bevorzugt $(AA)_n$ ist Lys-Ala-Arg-Val-Leu SEQ ID NO: 47, Ala-Arg-Val-Leu SEQ ID NO: 48, oder Arg-Val-Leu, und bevorzugt $(AA)_m$ ist Phe-Glu-Ala-Met SEQ ID NO: 49, Phe-Glu-Ala, Phe-Glu, oder Phe; oder bevorzugt $(AA)_n$ ist Pro-Phe-His-Leu SEQ ID NO: 50, oder Phe-His-Leu, und bevorzugt $(AA)_m$ ist Leu-Glu-Glu-Ser SEQ ID NO: 40, Leu-Glu-Glu, Leu-Glu, oder Leu; oder bevorzugt $(AA)_n$ ist Ser-Gln-Asn-Leu-Phe SEQ ID NO: 78, Gln-Asn-Leu-Phe SEQ ID NO: 51, Asn-Leu-Phe, Arg-Lys-Ile-Leu-Phe SEQ ID NO: 52, Lys-Ile-Leu-Phe SEQ ID NO: 53, oder Ile-Leu-Phe, und bevorzugt $(AA)_m$ ist Leu-Asp-Gly-NH₂, Leu-Asp-NH₂, oder Leu-NH₂. Insbesondere bevorzugt $(AA)_n$ ist Ser-Leu-Asn-Phe SEQ ID NO: 54, oder Leu-Asn-Phe, und insbesondere bevorzugt $(AA)_m$ ist Pro-Ile-Val, Pro-Ile oder Pro; oder insbesondere bevorzugt $(AA)_n$ ist Arg-Gly-Phe, und insbesondere bevorzugt $(AA)_m$ ist Pro.

[0092] Es wird erwartet, dass Substrate von HIV Proteasen von Formel V in Gesamtzelltests arbeiten, aber sie werden nicht in zellfreien Enzymtests arbeiten. Die Spaltung der $(AA)_n$ - $(AA)_m$ Amidbindung mittels HIV Proteasen in HIV infizierten Zellen wird Rhodamin welches an $(AA)_m$ anhaftet, ergeben. Amino-peptidasen die innerhalb der Zelle anwesend sind, werden dann das $(AA)_m$ entfernen, um den Fluoreszenzfarbstoff von VI zu ergeben. Verbindungen von Formel V können verwendet werden für das Screening von Inhibitoren von HIV Proteasen in HIV infizierten Zellen. Dies sollte den Prozess für die Entdeckung von neuen HIV Proteasen Inhibitoren beschleunigen. Insbesondere die Entdeckung von nicht peptidischen oder nicht peptidomimetrischen HIV Protease Inhibitoren, welche zu besseren Anti-HIV Mitteln führen können, als die bisher verfügbaren Drogen. Da HIV Protease virale Precursor Proteine in einem späteren Zustand bei der viralen Replikation entwickelt kann ein zellpermeables fluorogenes oder fluoreszierendes Substrat für eine HIV Protease verwendet werden, um Verbindungen zu Screenen, die Gentranskription oder -translation viralen Eintrag oder andere Schlüsselproteine in einem frühen Stadium der HIV Infektion hemmen. Daher kann dieses Verfahren zur Identifikation von Inhibitoren von HIV Infektionen mit einem neuen Mechanismus führen, welcher nicht in einem zellfreien Enzymtest identifiziert werden kann. Zusätzlich, da HIV Proteasen in HIV infizierten Zellen die zellpermeablen Substrate der Formel V spalten, um den Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIII innerhalb der Zelle zu ergeben, können die Substrate der Formel V ebenfalls verwendet werden für die Diagnose von HIV Infektionen.

[0093] Verbindungen der Formel V können so ausgelegt werden, dass die Substrate von Adenovirus Proteasen sind. Adenoviren sind der Grund von verschiedenen Krankheiten, einschließlich Krankheiten des Respirationstrakts aufgrund von Sporen und epidemischer akuter Atemwegserkrankungen, die zu Pneumonie führen können. Adenovirus Protease ist eine Cysteinprotease, die verschiedene virale Proteine spaltet und sie wird benötigt für Virusreifung und Infektivität (Weber, J.M., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199/1:227-235 (1995)). Die bevorzugten Substrate von Adenovirus Protease umfassen (M,L,I)XGX-G und (M,L,I)XGG-X. Die Spezifität der Substrate wird im wesentlichen bestimmt durch P₂ und P₄ Aminosäuren (Diouri, M., et al., J. Biol. Chem. 271:3251-32514 (1996)). Hydrophobe Aminosäuren wie Met, Leu und Ile sind bevorzugt bei P₄. Schmale Aminosäuren wie Gly sind bevorzugt bei P₂. Eine schmale und hydrophobe Aminosäure ist ebenfalls bevorzugt für P₁ und P_{1'}, wie Ala und Gly; während P₃ jegliche Aminosäure verwenden kann. Diese Beobachtungen werden geschützt durch kürzlich festgestellt Kristallstrukturen von menschlicher Adenovirus Proteinase mit seinen 11 Aminosäure Co-Faktoren und Substrat Modeling, basierend auf der Kristallstruktur (Ding, J., et al., EMBO J. 15:1778-1783 (1996)). Unter Ausnutzung des Vorteils des Vorhandenseins von Amino-peptidasen in Gesamtzellen können fluorogene oder fluoreszierende Substrate von Adenovirus Proteasen so ausgelegt werden, so dass sie Aminosäuren entweder nur von der P Seite oder sowohl von der P Seite als auch von der P' Seite von Adenovirus Protease Substraten zur Anwendung in Gesamtzelltests umfassen.

[0094] Für Verbindungen von Formel V, die ausgelegt werden, dass sie Substrate von Adenovirus Proteasen sind, ist R_7 bevorzugt Acetyl oder Cbz, bevorzugt ist $(AA)_n$ Leu-Arg-Gly-Gly SEQ ID NO: 55, Met-Arg-Gly-Gly SEQ ID NO: 56, Ile-Arg-Gly-Gly SEQ ID NO: 57, Leu-Val-Gly-Gly SEQ ID NO: 58, Met-Val-Gly-Gly SEQ ID NO: 59 oder Ile-Val-Gly-Gly SEQ ID NO: 60 und bevorzugt $(AA)_m$ ist Gly, Ala oder m = 0. Wenn m = 0 ist, wird die Spaltung der $(AA)_n$ -Rhodaminamidbindung durch die Adenovirus Protease den Fluoreszenzfarbstoff von Formel VIID produziert. Wenn m nicht 0 ist, wird die Spaltung der $(AA)_n$ - $(AA)_m$ Amidbindung durch Adenovirus Protease in den Zellen das Rhodamin anhaftend an $(AA)_m$ ergeben. Amino-peptidasen die innerhalb der Zelle anwesend sind werden dann das $(AA)_m$ entfernen, um den Fluoreszenzfarbstoff von Formel VIII zu ergeben. Verbindungen von Formel V können verwendet werden zum Screening von Inhibitoren von Adenovirus Proteasen in Adenovirus infizierten Zellen.

[0095] Verbindungen von Formel V können ebenfalls so ausgelegt werden, dass sie Substrate von Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) Protease sind. Humaner Herpes Simplex Virus Typ 1 ist verantwortlich für Herpes Labialis (Fieberbläschen). Die HSV-1 Protease ist eine Serin Protease und ist verantwortlich für proteolytische Entwicklung von sich selber und von ICP35 zum Aufbau von viralen Kapseln (Gao, M., et al., J. Virol. 68:3702-3712 (1994)). Zwei proteolytische Seiten wurden identifiziert als Ala247 und Ser248 und Ala610 und Ser611 innerhalb der Protease (Dilanni, C.L., et al., J. Biol. Chem. 268:25449-25454 (1993)). Kürzlich wurde ein Achtaminosäure Konsenspeptid von LVLASSSF SEQ ID NO: 61 gefunden, dass es gespalten werden konnte effektiv als ein 20-mer entwickeltes Seitenpeptid, und die P₄ bis P₁ Sequenz wurde definiert als das minimale Substrat Erkennungsdomain für die HSV-1 Protease (O'Boyle, D.R., et al., Virology 236:338-347 (1997)). Es wurde berichtet, dass die Spezifität der HSV Protease sich innerhalb der P₄-P₁' Region der Spaltungsseite befindet (McCann, P.J., et al., J Virol. 68:526-529 (1994)). In dem man den Vorteil des Vorhandenseins von Aminopeptidase in der gesamten Zelle nimmt, können fluorogene oder fluoreszierende Substrate von HSV-1 Protease so aufgebaut werden, dass die Aminosäuren entweder nur von dem P₄'-P₁ oder von sowohl dem P₄-P₁ und dem P' Ende der HSV-1 Protease Substrat zur Anwendung in Gesamtzelltests umfassen.

[0096] Verbindungen von Formel V, die dafür ausgelegt sind, dass sie Substrate von HSV-I Proteasen sind, ist R₇ vorzugsweise Acetyl oder Cbz, vorzugsweise bevorzugt (AA)_n ist Leu-Val-Leu-Ala SEQ ID NO:62, und bevorzugt (AA)_m ist Ser, Ser-Ser, oder m = 0. Wenn m gleich 0 ist, wird die Spaltung der (AA)_n-Rhodaminamidbindung durch die HSV-1 Protease Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIII produzieren. Wenn m nicht 0 ist, wird die Spaltung der (AA)_n-(AA)_m Amidbindung durch HSV-1 in der Zelle das Rhodamin anhaftend an (AA)_m ergeben. Aminopeptidasen, die innerhalb der Zelle anwesend sind, werden dann das (AA)_m entfernen, um den Fluoreszenzfarbstoff von VIII zu ergeben. Verbindungen der Formel V können daher verwendet werden für das Screening von Inhibitoren von HSV-1 Protease in HIV infizierten Zellen.

[0097] Verbindungen von Formel V können ebenfalls so ausgelegt werden, dass sie Substrate von humanem Cytomegalovirus (HCMV) Protease sind. HCMV kann lebensbedrohende Infektionen in kongenital infizierten Kindern, immunokompromisierten Individuen und in immunsuppremierten Krebs- oder Transplantationspatienten bewirken. Humaner Cytomegalovirus (HCMV) kodiert eine Protease, die in sich selbst spaltet und das HCMV Aufbauprotein und es ist wesentlich für die Virusreplikation, daher ist es potientes Target für therapeutische Intervention. Die HCMV Protease ist eine Serin Protease und zwei proteolytische Entwicklungsstellen innerhalb der Proteasen wurden identifiziert bei Ala 256-Ser 257 (Abgabeseite) und Ala 643-Ser 644 (Entwicklungsseite) (Sztevens, J.T., et al., Eur. J. Biochem. 226:361-367 (1994)). Ein fluorogenes Substrat, DA-BCYL-Arg-Gly-Val-Val-Asn-Ala-Ser-Ser-Arg-Leu-Ala-EDANS SEQ ID NO: 63 wurde synthetisiert und es wurde gefunden, dass sie effektiv durch CMV Protease an der Ala-Ser Peptidbindung gespalten werden kann (Hol-skin, B.P., et al., Anal. Biochem. 227:148-155 (1995)). Kürzlich wurde berichtet, dass der Ersatz der Val-Val-Asn Sequenz, die mit dem P₄-P₂ Rest der Entwicklungsseite des Enzyms korrespondiert, durch die optimierte Tbg-Tbg-Asn(Nme)₂ (Tbg, t-Butylglycin) Sequenz signifikant die Affinität des Substrats zu der Protease erhöht. Ein AMC fluorogenes Substrat wurde hergestellt mit der P Seiten Peptidsequenz, umfassend diese verbesserten Aminosäuren (Bonneau, P.R., et al., Anal. Biochem. 255:59-65 (1998)). In dem man den Vorteil der Gegenwart von Aminopeptidasen in der Gesamtzelle nimmt, können fluorogene oder fluoreszierende Substrate von HCMV Proteasen so ausgelegt werden, dass sie Aminosäuren sowohl von der P Seite oder sowohl von der P Seite und der P' Seite von HCMV Proteasensubstraten zur Anwendung in Gesamtzelltests umfassen.

[0098] Für Verbindungen der Formel V, die so ausgelegt sind, dass sie Substrate von HCMV Proteasen sind, ist bevorzugt R₇ Acetyl oder Cbz, bevorzugt (AA)_n ist Val-Val-Asn-Ala SEQ ID NO: 64 oder Tbg-Tbg-Asn-Ala SEQ ID NO: 65, und bevorzugt (AA)_m ist Ser, Ser-Ser, oder m = 0. Wenn m gleich 0 ist, wird die Spaltung von der (AA)_n-Rhodaminamidbindung durch die HCMV Protease einen Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIII produzieren. Wenn m nicht 0 ist wird die Spaltung der (AA)_n-(AA)_m Amidbindung durch HCMV in den Zellen das Rhodamin anhaftend an (AA)_m ergeben. Aminopeptidasen, die in der Zelle anwesend sind werden dann das (AA)_m entfernen, um das Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIII zu ergeben.

[0099] Verbindungen der Formel V können verwendet werden für das Screening von Inhibitoren von HCMV Proteasen in HCM infizierten Zellen. Verbindungen von Formel V können ebenfalls so ausgelegt werden, dass die Substrate von Hepatitis C Virus (HCV) Protease sind. HCV ist ein großer Verursacher von sowohl parainteral vermittelter und Sporen non-A und non-B Hepatitis, welche schätzungsweise 50 Millionen Menschen weltweit infiziert. HCV Protease NS3 und sein Proteinaktivitar NS4A nimmt teil bei der Entwicklung von dem viralen Poyprotein, daher ist der NS3/4A Protease Komplex ein attraktives Ziel für eine antivirale Therapie gegen HCV. Die HCV Protease ist eine Serinprotease und Cys-Ser wurde identifiziert als Spaltungsort. Eine der Substratssequenzen ist Asp-Asp-Ile-Val-Pro-Cys-Ser-Met-Ser-Tyr SEQ ID NO: 66, und P1 Cys und P3 Val wurden gefunden, dass sie kritisch sind (Zhang, R., et al., J. Virol. 71:6208-6213 (1997)). Unter Ausnutzung des Vorteils des

Vorhandenseins von Aminopeptidase in der Gesamtzelle werden fluorogene oder fluoreszierende Substrate von HCV Proteasen so ausgelegt, dass sie Aminosäuren von sowohl der P Seite und der P' Seite von HCV Proteasesubstraten für die Anwendung in Gesamtzelltests umfassen.

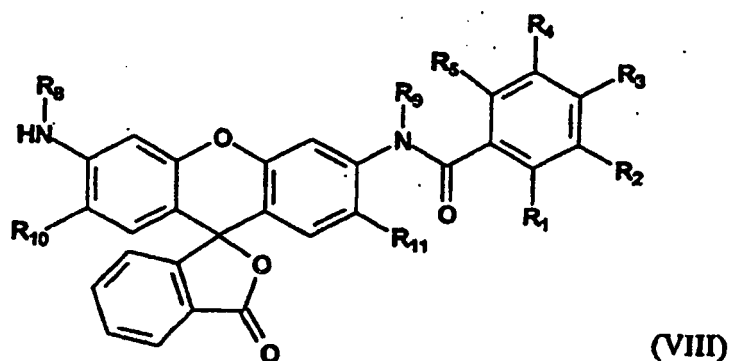
[0100] Für Verbindungen von Formel V, ausgelegt, dass sie Substrate von HCV Protease sind, ist bevorzugt R_7 ist Acetyl oder Cbz, bevorzugt $(AA)_n$ ist Asp-Asp-Ile-Val-Pro-Cys SEQ ID NO: 67, Asp-Ile-Val-Pro-Cys SEQ ID NO: 68, oder Ile-Val-Pro-Cys SEQ ID NO: 69 und bevorzugt $(AA)_m$ ist Ser-Met-Ser-Tyr SEQ ID NO: 70, Ser-Met-Ser, Ser-Met, Ser, oder $m = 0$. Wenn $m = 0$ ist wird die Spaltung von der $(AA)_n$ Rhodaminamidbindung durch die HCV Protease den Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIII bilden. Wenn m nicht 0 ist, wird die Spaltung der $(AA)_n$ - $(AA)_m$ Amidbindung durch HCV in den Zellen das Rhodamin anhaftend an $(AA)_m$ ergeben. Aminopeptidasen die innerhalb der Zelle anwesend sind werden dann das $(AA)_m$ entfernen, um Fluoreszenzfarbstoff der Formel VIID zu ergeben. Verbindungen von Formel V können verwendet werden zum Screening von Inhibitoren von HCV Protease in HCV infizierten Zellen.

[0101] Im Licht des oben gesagten sind bestimmte bevorzugte Verbindungen von Formel V diejenigen, worin R_7 ist eine N-terminale Schutzgruppe, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus t-Butyloxycarbonyl, Acetyl, Octanoyl, Dodecanoyl, Benzyloxycarbonyl und Pentafluorbenzoyl.

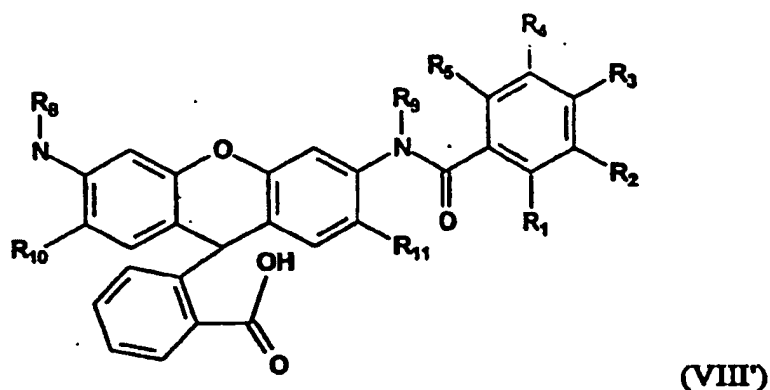
[0102] In derartigen Verbindungen kann $(AA)_n$ - $(AA)_m$ ausgewählt werden aus der Gruppe, SQNY-PIV (SEQ ID NO:28), ARVL-AEA (SEQ, ID NO:29), ATIM-MQR (SEQ ID NO:30), RQAN-FLG, (SEQ ID NO:31), PG-NF-LQS, (SEQ ID NO:32), SFSF-PQI (SEQ ID NO:33), TLNF-PIS (SEQ ID NO:34), AETF-YVD (SEQ ID NO:35) oder RKVL-FLD (SEQ ID NO:36); SQNY-PI (SEQ ID NO:117), ARVL-AE (SEQ ID NO:118), ATIM-MQ (SEQ ID NO:119), RQAN-FL (SEQ ID NO:120), PGNF-LQ (SEQ ID NO:121), SFSF-PQ (SEQ ID NO:122), TLNF-PI (SEQ ID NO:123), AETF-YV (SEQ ID NO:124) oder RKVL-FL (SEQ ID NO:125); SQNY-P (SEQ ID NO:126), ARVL-A (SEQ ID NO:127), ATIM-M (SEQ ID NO:128), RQAN-F (SEQ ID NO:129), PGNF-L (SEQ ID NO:130), SFSF-P (SEQ ID NO:131), TLNF-P (SEQ ID NO:132), AETF-Y (SEQ ID NO:133) und RKVL-F (SEQ ID NO: 134), oder $(AA)_n$ - $(AA)_m$ kann ausgewählt werden aus der Gruppe aus LRGGG (SEQ ID NO:101), LRGGA (SEQ ID NO:102), MRGGG (SEQ ID NO:96), MRGGA (SEQ ID NO:135), IRGGG (SEQ ID NO:97), IRGGA (SEQ ID NO:136); LVGGG (SEQ ID NO:98), LVGGA (SEQ ID NO:137), MVGGG (SEQ ID NO:99), MVGGA (SEQ ID NO:138), NGGG (SEQ ID NO:100), NGGA (SEQ ID NO:139), LRGG (SEQ ID NO:55), MRGG (SEQ ID NO:56), IRGG (SEQ ID NO:57) LVGG (SEQ ID NO:58), MVGG (SEQ ID NO: 59) und NGG (SEQ ID NO:60).

[0103] Die neuen Verbindungen der Formel VIII sind Derivate eines Rhodamins, erhalten durch Einführen einer fluor- oder chlosubstituierten benzoylblockierenden Gruppe in ein oder zwei Aminogruppen in einem Rhodamin. Die HNR_8 Gruppe in Formel VIID liefert den Angriffspunkt für die Reaktion mit einem potentiellen Enzymsubstrat wie die Carboxylgruppe eines N-blockierten Peptids um eine Peptidamidbindung zu bilden. Die Reaktion wird das Fluoreszenzmolekül von Formel VIII in ein nicht fluoreszierendes Molekül der Formel IV oder V umsetzen und wird ein Peptid-Reportermolekül produzieren, welches als ein Substrat für eine Protease oder Peptidase fungiert. Spaltung der spaltbaren Peptid-Reporteramidbindung in dem Peptidreporter durch Proteasen oder Peptidasen produziert eine Verbindung der Formel VIII oder VIII', die fluoreszierend ist. Ganz wichtig ist, dass die hydrophobe fluor- oder chlosubstituierte benzoylblockierende Gruppe so gestaltet ist, dass sie die Zellpermeabilität der Substrate von Formel I erhöht. Die fluor- oder chlosubstituierte Benzoylgruppe ist so ausgeführt, dass sie mit Nukleophilen reagiert, die innerhalb der Zelle anwesend sind, so dass dies in einer Akkumulation der Substrat von Formel I innerhalb der Zelle resultiert als auch in einem Anstieg der Retention der Fluoreszenzhälfte innerhalb der Zelle nach Spaltung durch Targetenzyme. Ergänzend wird durch den Austausch durch die Fluor oder Chlorgruppe durch ein Nukleophil erwartet, dass die Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzhälfte des Substrats von Formel I ansteigt.

[0104] Spezifisch sind die neuen Fluoreszenzfarbstoffe von Formel VIII:



oder biologisch akzeptabel Salze davon, worin R_1 - R_5 , R_8 - R_{11} wie oben mit Bezug auf die Formeln ID und ID definiert sind. Die Verbindungen von Formel VIII können in tautomeren Formen, insbesondere der ringgeöffneten Form von Formel VIII' existieren. Die Tautomeren Formen umfassen VIII und VIII'.



[0105] Bevorzugte fluorogene oder fluoreszierende Substrate der vorliegenden Erfindung umfassend, aber sie sind nicht limitierte auf

N-(Z-WEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:1)
 N-(Z-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-LEND)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:3)
 N-(Z-DETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:4)
 N-(Z-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-VEND)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:7)
 N-(Z-LETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:8)
 N-(Z-LEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:3)
 N-(Z-IEPD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:23)
 N-(Z-VEPD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:27)
 N-(Z-SHVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:10)
 N-(Z-DELD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:11)
 N-(Z-DGPD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:12)
 N-(Z-DEPD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:13)
 N-(Z-DGTD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:14)
 N-(Z-DLND)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:15)
 N-(Z-DEED)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:16)
 N-(Z-DSLD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:17)
 N-(Z-DVPD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:18)
 N-(Z-DEAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:19)
 N-(Z-DSYD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:20)
 N-(Z-ELPD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:21)
 N-(Z-VEID)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:26)
 N-(Z-IETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:24)
 N-(Z-VD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-TD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-AD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-VAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-DEVDG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:76)

N-(Z-EVDG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:71)
 N-(PFB-DEVDG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:76)
 N-(PFB-EVDG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:71)
 N-(PFB-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Octanoyl-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(PFB-EVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Boc-WEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:1)
 N-(Boc-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Ac-LETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:8)
 N-(Ac-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Ac-IETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:24)
 N-(Ac-LQTD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:72)
 N-(Ac-EETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:73)
 N-(Ac-LEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:9)
 N-(Ac-AEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:74)
 N-(Ac-WEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:1)
 N-(Ac-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Ac-D(OEt)E(OEt)VD(OEt))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Ac-LEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:3)
 N-(Z-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Ac-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Ac-IETD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:24)
 N-(Ac-LQTD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:72)
 N-(Ac-EETD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:73)
 N-(Ac-LEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:9)
 N-(Ac-AEHD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:74)
 N-(Ac-WEHD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:1)
 N-(Ac-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 116, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 116, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 19, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 19, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-YVAD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-LE(OAM)HD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:3)
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)TD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:4)
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-D(OMe)E(OMe)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-D(OMe)E(OMe)VD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Z-VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-E(OAM)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MGA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MAG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-G-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-G-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-G-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-G-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(Ac-SLNFPIV)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:80)
 N-(Ac-SLNFPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:81)
 N-(Ac-SLNFPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:82)

N-(Ac-LNFPIV)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:83)
 N-(Ac-LNFPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:84)
 N-(Ac-LNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:85)
 N-(Ac-RGFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:37)
 N-(Z-LNFPIV)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:83)
 N-(Z-LNFPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:84)
 N-(Z-LNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:85)
 N-(Z-RGFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:37)
 N-(Z-RQANFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:31)
 N-(Z-RQANFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:86)
 N-(Z-RQANF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:87)
 N-(Z-RKVLFLD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:36)
 N-(Z-RKVLFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:88)
 N-(Z-RKVLF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:89)
 N-(Z-ARVLFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:90)
 N-(Z-ARVLFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:91)
 N-(Z-ARVLF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:92)
 N-(Z-SQNYFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:93)
 N-(Z-SQNYFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:94)
 N-(Z-SQNYF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:95)
 N-(Ac-SLNFPN)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:80)
 N-(Ac-SLNFP)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:81)
 N-(Ac-SLNFP)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:82)
 N-(Ac-RGFP)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:37)
 N-(Ac-SLNFPN)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:80)
 N-(Ac-SLNFP)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:81)
 N-(Ac-SLNFP)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:82)
 N-(Ac-RGFP)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:37)
 N-(Ac-MRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:96)
 N-(Ac-IRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:97)
 N-(Ac-LVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:98)
 N-(Ac-MVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:99)
 N-(Ac-NGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 100)
 N-(Ac-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:101)
 N-(Ac-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 102)
 N-(Ac-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:55)
 N-(Z-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:101)
 N-(Z-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 102)
 N-(Z-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:55)
 N-(Ac-LRGGG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:101)
 N-(Ac-LRGG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 102)
 N-(Ac-LRGG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:55)
 N-(Ac-LRGGG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:101)
 N-(Ac-LRGG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:102)
 N-(Ac-LRGG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:55)
 N-(Ac-LVLASSS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:103)
 N-(Ac-LVLASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 104)
 N-(Ac-LVLAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:105)
 N-(Ac-LVLA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:62)
 N-(Z-LVLASSS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 103)
 N-(Z-LVLASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 104)
 N-(Z-LVLAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 105)
 N-(Z-LVLA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:62)
 N-(Ac-LVLASS)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:104)
 N-(Ac-LVLAS)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:105)
 N-(Ac-LVLA)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:62)
 N-(Ac-LVLASS)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 10, (SEQ ID NO: 104)
 N-(Ac-LVLAS)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 105)
 N-(Ac-LVLA)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:62)
 N-(Ac-VVNASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:106)

N-(Ac-VVNAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 107)
 N-(Ac-VVNA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:64)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:108)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 109)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:110)
 N-(Z-Tbg-Tbg-NASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:108)
 N-(Z-Tbg-Tbg-NAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:109)
 N-(Z-Tbg-Tbg-NA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:110)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:108)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:109)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:110)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 108)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 109)
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 110)
 N-(Ac-DDIVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:111)
 N-(Ac-DIVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:112)
 N-(Ac-IVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:113)
 N-(Ac-IVPCSMS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 114)
 N-(Ac-IVPCSM)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:115)
 N-(Ac-IVPCS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 116)
 N-(Ac-NPC)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:69)
 N-(Z-IVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 113)
 N-(Z-IVPCSMS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:114)
 N-(Z-IVPCSM)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 115)
 N-(Z-IVPCS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:116)
 N-(Ac-IVPCSMS)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:114)
 N-(Ac-IVPCSM)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:115)
 N-(Ac-IVPCS)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:116)
 N-(Ac-IVPCSMS)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 114)
 N-(Ac-IVPCSM)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO: 115)
 N-(Ac-IVPCS)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:116)
 worin Z Benzyloxycarbonyl ist, BOC tert.-butoxycarbonyl ist, ist Acetyl Ac, PFB Pentafluorbenzoyl ist, Tbg t-Bu-tylglycin ist, und AM Acetoxymethyl ist.

[0106] Besonders bevorzugte Verbindungen der Erfindung sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

N-(Z-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Z-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Ac-LETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:8)
 N-(Ac-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:5)
 N-(Ac-IETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:24)
 N-(Ac-LQTD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:72)
 N-(Ac-EETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:73)
 N-(Ac-LEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:9)
 N-(Ac-AEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:74)
 N-(Ac-WEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:1)
 N-(Ac-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:2)
 N-(Ac-LEND)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110, (SEQ ID NO:3)
 N-(Ac-D(OEt)E(OEt)VD(OEt))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5).
 N-(Z-VAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-VD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110.
 N-(PFB-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Octanoyl-DEVD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-DEVGD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(PFB-DEVGD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76).
 N-(Z-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Ac-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Ac-IETD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:24),
 N-(Ac-LQTD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:72),
 N-(Ac-LQTD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:72),

N-(Ac-EETD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:73),
 N-(Ac-LEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:9),
 N-(Ac-AEHD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:74),
 N-(Ac-WEHD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:1),
 N-(Ac-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEVDG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-YVAD)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEVD)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VAD)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(Z-DEVDG)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-DEVD)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-DEVDG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-YVAD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-E(OAM)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-D(OMe)E(OMe)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VD(OAM))-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 und

N-(Z-VD(OAM))-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110;
 oder ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(MG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-M-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MAG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MGA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-M-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-M-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, und
 N-M-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110;

oder ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Ac-SLNFPN)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 80)
 N-(Ac-SLNFPPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 81)
 N-(Ac-SLNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 82)
 N-(Ac-LNFPN)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 83)
 N-(Ac-LNFPPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 84)
 N-(Ac-LNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 85)
 N-(Ac-RGFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 37)
 N-(Z-LNFPN)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 83)
 N-(Z-LNFPPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 84)
 N-(Z-LNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 85)
 N-(Z-RGFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 37)
 N-(Z-RQANFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 31)
 N-(Z-RQANFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 86)
 N-(Z-RQANF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 87)
 N-(Z-RKVLFLD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 36)
 N-(Z-RKVLFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 88)
 N-(Z-RKVLFLF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 89)
 N-(Z-ARVLFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 90)
 N-(Z-ARVLFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 91)
 N-(Z-ARVLFLF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 92)
 N-(Z-SQNYFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 93)
 N-(Z-SQNYFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 94), und

N-(Z-SQNYF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 95);
 oder ausgewählt sind der Gruppe, bestehend aus:
 N-(Ac-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 101),
 N-(Ac-MRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 96),
 N-(Ac-IRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 97),
 N-(Ac-LVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 98),
 N-(Ac-MVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 99),
 N-(Ac-NGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 100),
 N-(Ac-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 102),
 N-(Ac-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 35),
 N-(Z-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 101),
 N-(Z-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 102), und
 N-(Z-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 55);
 oder ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:
 N-(Ac-LVLASSS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 103),
 N-(Ac-LVLASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 104),
 N-(Ac-LVLAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 105),
 N-(Ac-LVLA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 62),
 N-(Z-LVLASSS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 103),
 N-(Z-LVLASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 104),
 N-(Z-LVLAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 105), und
 N-(Z-LVLA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 62),
 oder ausgewählt sind der Gruppe, bestehend aus:
 N-(Ac-VVNASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 106),
 N-(Ac-VVNAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 107),
 N-(Ac-VVNA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 64),
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 108),
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 109),
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 110),
 N-(Z-Tbg-Tbg-NASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 108),
 N-(Z-Tbg-Tbg-NAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 109),
 N-(Z-Tbg-Tbg-NA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 110),
 oder ausgewählt sind der Gruppe, bestehend aus:
 N-(Ac-DDIVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 111),
 N-(Ac-DIVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 112),
 N-(Ac-IVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 113),

N-(Ac-IVPCSMS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 114),

N-(Ac-IVPCSM)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 115),
 N-(Ac-IVPCS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 116),
 N-(Ac-NPC)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 69),
 N-(Z-IVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 113),
 N-(Z-IVPCSMS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 114),
 N-(Z-IVPCSM)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 115), und
 N-(Z-IVPCS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 116).

[0107] Die neuen Fluoreszenzfarbstoffe mit der Formel VIII, umfassen, aber sie sind nicht limitiert auf
 N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(4-fluoro-3-trifluoromethylbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(2,3,5,6-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(2,3,4-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(2,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 116,
 N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 19,
 N-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 116,
 N-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 19,

N-(4-fluoro-3-trifluoromethylbenzoyl)-Rhodamin 116, and
N-(4-fluoro-3-trifluoromethylbenzoyl)-Rhodamin 19.

[0108] Nützliche Arylgruppen sind C_{6-14} Aryl, insbesondere C_{6-10} Aryl. Typische C_{6-14} Arylgruppen umfassen Phenyl, Naphthyl, Phenanthryl, Anthracyl, Indenyl, Azulenyl, Biphenyl, Biphenylenyl und Fluorenyl Gruppen.

[0109] Nützliche Cycloalkylgruppen sind C_{3-8} Cycloalkylgruppen, bevorzugt Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl und Cycloheptyl.

[0110] Nützliche Alkylgruppen umfassen drahtkettige und verzweigte C_{1-12} Alkylgruppen, vorzugsweise C_{1-10} Alkylgruppen, besonders bevorzugt C_{1-6} Alkylgruppen. Typische C_{1-12} Alkylgruppen umfassen, Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, sec-butyl, tert-butyl, 3-pentyl, Hexyl und Octylgruppen.

[0111] Nützliche Acyl (Alkanoyl) Gruppen sind C_{2-10} Alkanoylgruppen wie Acetyl, Propyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, und dergleichen als auch die verzweigtkettigen Isomere.

[0112] Nützliche Alkenylgruppen sind C_{2-6} Alkenylgruppen, umfassend Ethenyl, Propenyl, Isopropenyl, Butenyl, und sekundär Butenyl.

[0113] Nützliche Alkynylgruppen sind C_{2-6} Ethynyl, Propynyl, Isopropynyl, Butynyl, und 2-Butynyl Gruppen.

[0114] Nützliche Aralkylgruppen umfassen jegliche der zuvor genannten C_{1-10} Alkylgruppen, die substituiert sind durch jede der zuvor genannten C_{6-14} Arylgruppen. Besonders bevorzugte Gruppen umfassen Benzyl, Phenetyl und Naphthylmethyl..

[0115] Nützliche Aralkenylgruppen umfassen jegliche der zuvor genannten C_{2-4} Alkenylgruppen, substituiert durch jegliche der zuvor genannten C_{6-14} Arylgruppen.

[0116] Nützliche Aralkynylgruppen umfassen jegliche der zuvor genannten C_{2-4} Alkynylgruppen, substituiert durch jegliche der zuvor genannten C_{6-14} Arylgruppen. Besonders nützliche Gruppen umfassen Phenylethynyl und Phenylpropynyl.

[0117] Nützliche Haloalkylgruppen umfassen jegliche der zuvor genannten C_{1-10} Alkylgruppen, substituiert durch ein oder mehrere Fluor, Chlor, Brom oder Jod Atome, z. b. Fluormethyl, Difluormethyl, Trifluormethyl, Pentafluorethyl, 1,1-Difluorethyl, Chlormethyl, Chlorfluormethyl und Trichlormethylgruppen.

[0118] Nützliche Hydroxyalkylgruppen umfassen jegliche der zuvor genannten C_{1-10} Alkylgruppen, substituiert durch Hydroxy, z. B. Hydroxymethyl, Hydroxyethyl, Hydroxypropyl und Hydroxybutyl Gruppen.

[0119] Nützliche Alkoxygruppen schließen Sauerstoff ein, substituiert durch eine der oben erwähnten C_{1-10} Alkylgruppen.

[0120] Nützliche Alkylthiogruppen umfassen Schwefel, substituiert durch eine der oben erwähnten C_{1-10} Alkylgruppen.

[0121] Nützliche Acylaminogruppen sind die oben erwähnten C_{1-6} Acyl (Alkanoyl) Gruppen, verknüpft mit einem Aminostickstoff z. B. einem Acetamido, Propionamido, Butanoylamido, Pentanoylamido, Hexanoylamido als auch Aryl substituierten C_{2-6} Acylgruppen.

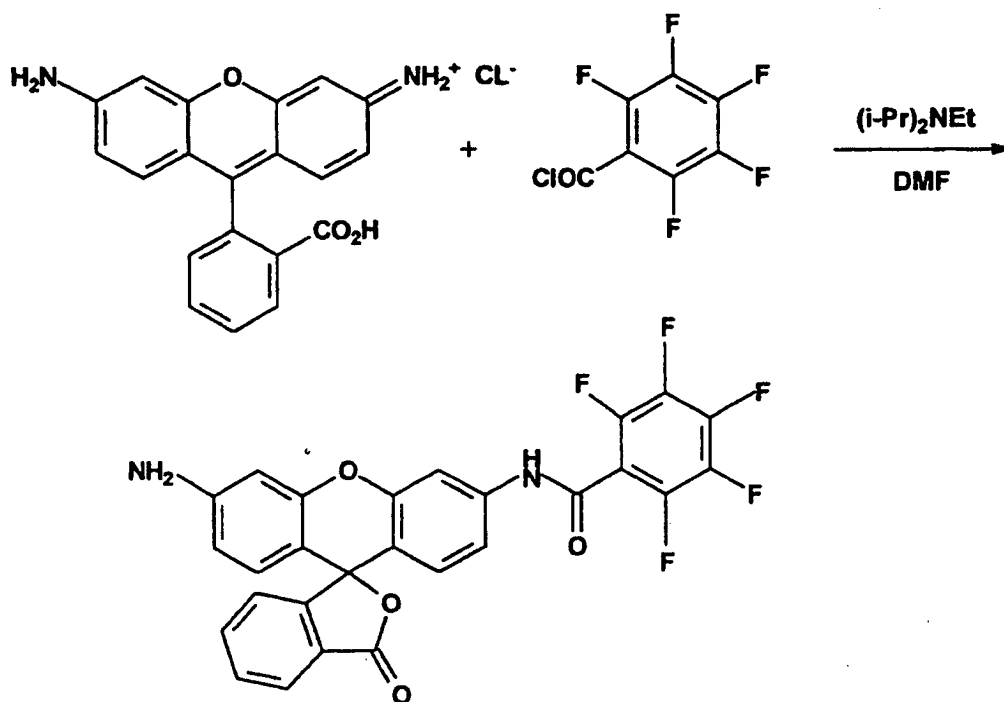
[0122] Nützliche Acyloxygruppen sind jegliche der zuvor genannten C_{1-6} Acyl (Alkanoyl) Gruppen, verknüpft mit einer oxy (-O-) Gruppe, z. B. Acetoxy, Propionoyloxy, Butanoyloxy, Pentanoyloxy, Hexanoyloxy und dergleichen.

[0123] Nützliche Aminogruppen umfassen $-NH_2$, $-NHR_{14}$ und $-NR_{14}R_{14}$, worin R_{15} und R_{15} C_{1-10} Alkyl oder C_{3-8} Cycloalkylgruppen wie oben definiert sind.

[0124] Bestimmte der Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in tautomeren Formen, insbesondere im Y-Teil der Formel II vorliegen. Die Erfindung umfasst alle derartigen Tautomere. Die Erfindung umfasst ebenfalls Stereoisomere, die racemischen Mischungen derartiger Stereoisomere als auch die einzelnen Enantiomere, die mittels Methoden, die dem Stand der Technik bekannt sind, getrennt werden können.

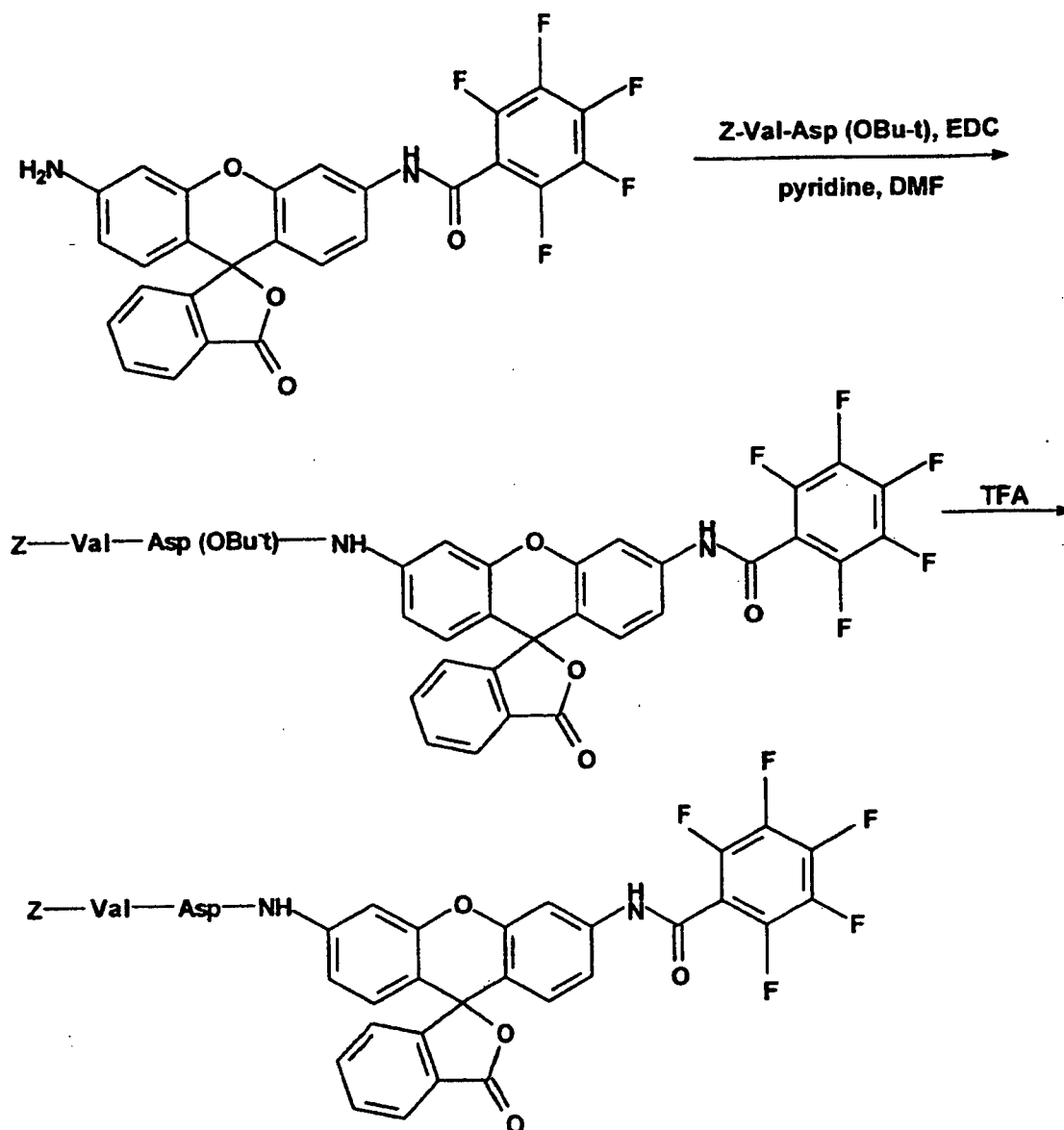
[0125] Die Verbindungen der Erfindung können hergestellt werden unter Verwendung von Methoden, die im Stand der Technik bekannt sind. Was die Verbindungen der Formel VIII betrifft, können diese hergestellt werden, wie dies durch die beispielhaften Reaktionen in Schema 1 erläutert ist.

Schema 1

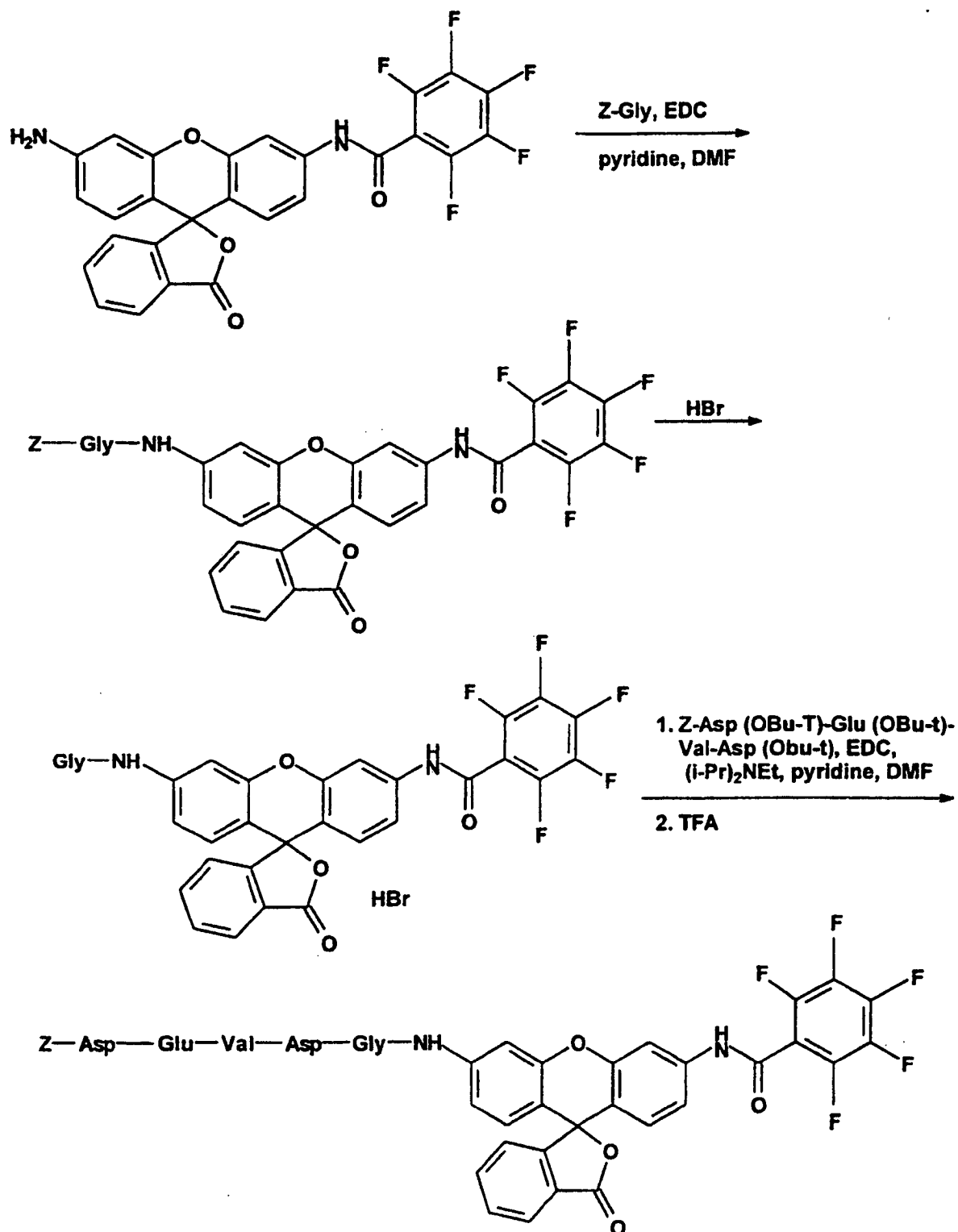


[0126] Verbindungen mit den Formeln I-V können hergestellt werden, wie diese durch die Beispielsreaktionen in den Schemata 2-3 erläutert werden.

Schema 2

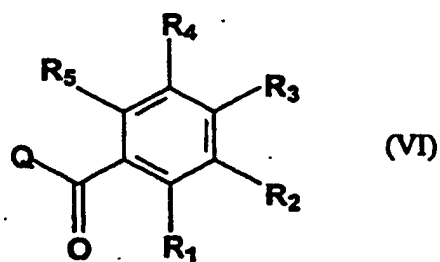


Schema 3

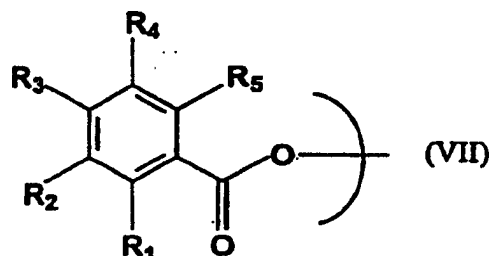


[0127] Bestimmte Verbindungen der Formel IV können erhalten werden durch ein Verfahren umfassend die Schritte:

(a) Reagieren von Rhodamin mit einer Verbindung der Formel (VI)



worin R_1 - R_5 wie oben definiert sind und Q Halogen, Hydroxy oder eine Gruppe der Formel VII ist:



worin R_1 - R_5 wie oben definiert sind,

um das substituierte Benzoyl-Rhodamin der Formel VIII zu ergeben;

- (a) Kondensieren des substituierten N-Benzoyl-Rhodamins zusammen mit N-Z-Gly um N-Z-Gly-N' substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- (b) Entfernen der Z Gruppe, um N-Gly-N' substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- (c) Kondensieren von N-Gly-N' substituiertem Benzoyl-Rhodamin mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t) um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t)-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und
- (d) Entfernen der OBu-t Schutzgruppe um N-(Z-(AA)_n-Asp-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben.

[0128] Alternativ kann der Schritt des Einführens von Gly vermieden werden und eine Verbindung der allgemeinen Formel IV kann erhalten werden durch ein Verfahren, umfassend die Schritte:

- (a) Reaktion von Rhodamin mit einer Verbindung der Formel VI um ein substituiertes N-Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- (b) Kondensieren des substituierten N-Benzoyl-Rhodamins mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t) um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t)-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und
- (c) Entfernen der OBu-t Schutzgruppe um N-(Z-(AA)_n-Asp)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben.

[0129] In einem bevorzugten Verfahren ist -(AA)_n WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP oder IET.

[0130] In verschiedenen weiteren Aspekten liefert die Erfindung daher ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel IV umfassend:

- (a) Reaktion von Rhodamin mit einem substituierten Benzoylchlorid um ein endsubstituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- (b) Kondensieren des N-substituierten Benzoyl-Rhodamins zusammen mit N-Z-Gly, um N-Z-Gly-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben.
- (c) Entfernen der Z Gruppe, um N-Gly-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- (d) Kondensieren von N-Gly-N'-substituiertem Benzoyl-Rhodamin mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t) um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t)-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und
- (e) Entfernen der OBu-t Schutzgruppe um N-(Z-(AA)_n-Asp-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben und

ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel IV, umfassend,

- (a) Reaktion von Rhodamin mit einem substituierten Benzoylchlorid um N-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- (b) Kondensieren des N-substituierten Benzoyl-Rhodamins zusammen mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t) um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t)-Gly)-N' substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und
- (c) Entfernen der OBu-t Schutzgruppe um N-(Z-(AA)_n-Asp)-N' substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben

ben.

[0131] In bestimmten Ausführungsformen dieser Aspekte ist $n=3$ und $-(AA)_n$ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP und IET.

[0132] Verbindungen der Formel IV können ebenfalls hergestellt werden unter Verwendung eines Anhydrids anstelle eines Acyl (Alkanoyl) Chlorids oder einer Säure mit einem Kupplungsreagenz wie EDC anstelle von Acyl (Alkanoyl) Chlorid. Andere Reagenzien können verwendet werden anstelle von Pentafluorbenzoylchlorid einschließlich aber nicht limitierend auf 2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl Chlorid, 2,4,5-trifluorbenzoyl Chlorid und 2,3,4 trifluorbenzoyl Chlorid. Die Reaktion wird durchgeführt in der Gegenwart einer Base wie $(Et)_3N$, $(i-Pr)_2$ -Net oder Pyridin, und das bevorzugte Lösungsmittel ist DMF. Die Reaktion wird im allgemeinen ausgeführt bei Raumtemperatur. Das Verhältnis von Acylchlorid zu Rhodamin ist etwa 1:1.

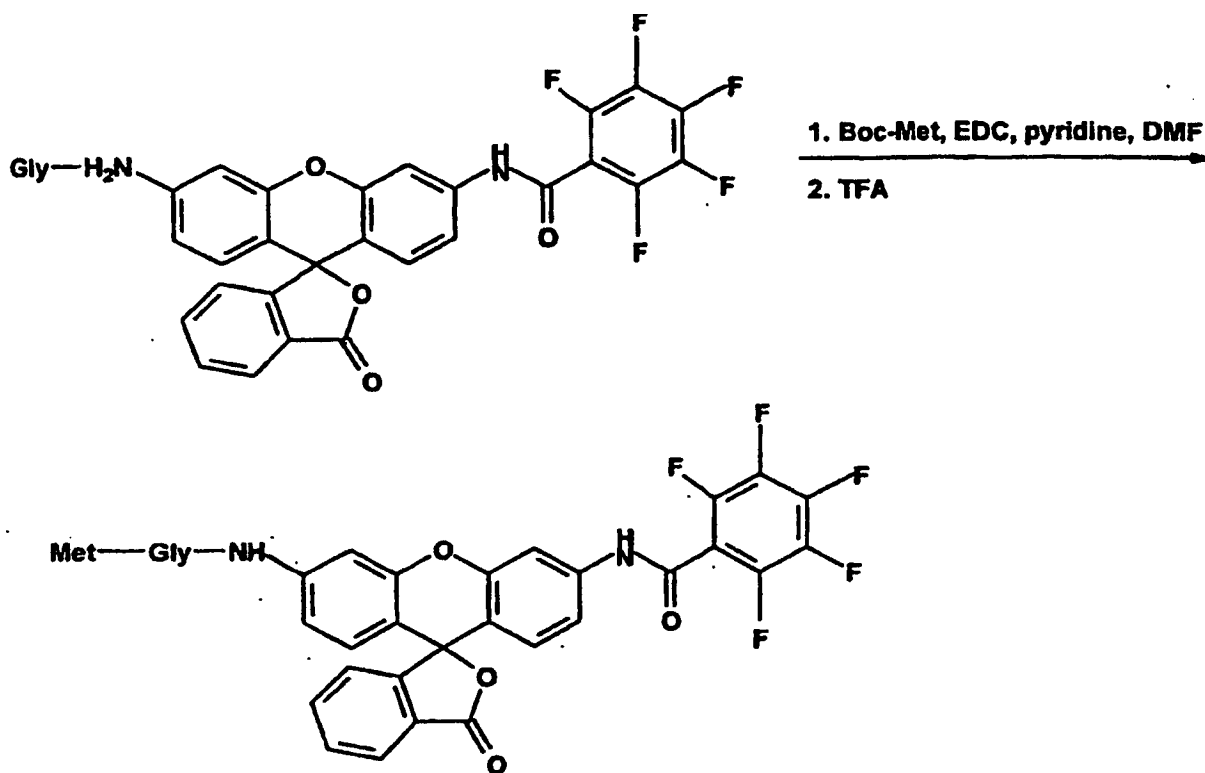
[0133] Die Konzentrationsreaktion kann durchgeführt werden unter Verwendung von jeglichem konventionellen Kondensierungsmittels, welches für die Peptidsynthese verwendet wird. In einem bevorzugten Verfahren ist das Kondensierungsmittel EDC, EEDQ, IBCF oder andere bekannte Kondensierungsmittel für Peptidsynthesen, und das Lösungsmittel für die Reaktion ist Pyridin oder Dimethylformamid (DMF). Die Reaktion wird im allgemeinen ausgeführt bei Raumtemperatur. Das Verhältnis des Kondensierungsmittels zu N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin ist etwa 3:1 bis 1,1:1 und das Verhältnis der geschützten Aminogruppe oder dem Peptid zu Pentafluorbenzoyl-Rhodamid oder N-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamid ist etwa 3:1 bis 1.1:1.

[0134] Das Kondensieren von N-substituiertem Benzoyl-Rhodamin mit einem Peptid wie $Z-(AA)_n$ -Asp(OBu-t) um $N-(Z-(AA)_n$ -Asp(OBu-t)-Gly))-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin in einer Einschrittreaktion zu ergeben ist ein bevorzugtes Verfahren. Daher liefern die Verbindungen von Formel VIII Fluoreszenzfarbstoffe, die mit jeglichem Peptid oder anderen Strukturen für die Herstellung von fluorogenen oder fluoreszierenden Verbindungen die Substrate für Proteasen oder Peptidasen sind, kondensiert werden.

[0135] Prinzipiell können die Verbindungen von Formel IV hergestellt werden durch eine erste Kondensation eines Peptids mit einem Rhodamin, um N-Peptid-Rhodamin zu ergeben, dann Reaktion des N-Peptid-Rhodamins mit Pentafluorbenzoylchlorid oder anderen Acylierungsreagenzien um z. B. N-Pentafluorbenzoyl-N'-Peptid-Rhodamin zu ergeben. Jedoch (a) Peptide im allgemeinen sind sehr viel teurer als Acylchloride oder Anhydride, (b) die Konzentrationsreaktion zwischen Peptid und Rhodamin ist keine effiziente Reaktion. Für diese Reaktionen wird bevorzugt, dass Peptid an das N-Pentafluorbenzoyl-Rhodamin zu verknüpfen als die Verknüpfung der Acylgruppe an das N-Peptid-Rhodamin.

[0136] Verbindungen mit der Formel V können hergestellt werden wie durch die Beispielsreaktion in Schema 4 erläuterte wird.

Schema 4



[0137] Die Reporterverbindungen der vorliegenden Erfindung können in einem Verfahren zum Bestimmen verwendet werden, ob eine Testsubstanz einen Effekt auf ein Enzym hat, welches in der Apoptose Kaskade in einer Testzelle involviert ist, wobei das Verfahren umfasst

- (a) Kontaktieren der Testzelle mit der Testsubstanz und der Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Testsubstanz entweder mit einem externen Membranrezeptor interagiert oder in die Zelle aufgenommen wird und die Reporterverbindung in die Zelle aufgenommen wird, und
- (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Testzelle; worin eine Veränderung der Fluoreszenz sowohl der Größe oder der Wellenlänge innerhalb der Testzelle, verglichen mit der Kontrollzelle, die nur kontaktiert wurde mit der Reporterverbindung und nicht mit der Testsubstanz, eine Indikation ist, dass die Testsubstanz einen Effekt auf das Enzym hat.

[0138] Die durch dieses Verfahren erhaltenen Ergebnisse können verglichen werden mit Ergebnissen, die mit Testverbindungen erhalten wurden, die bekannt sind, da sie Enzyme beeinflussen, die in der Apoptose Kaskade in Zellen involviert sind, um ein Maß der relativen Effektivität der Testsubstanz zu generieren. Verbindungen, die verwendet werden können, umfassen bekannte Aktivatoren und Inhibitoren von Enzymen, die in der Apoptose Kaskade involviert sind. Aktivatoren, entweder durch direkte oder indirekte Mechanismen von Enzymen, involviert in die Apoptose Kaskade, umfassen aber sind nicht limitiert auf bekannte chemotherapeutische Mittel wie Etoposid (Yoon, H.J., et al., *Biochim Biophys Acta* 1395:110-120(1998)) und Doxorubizin (Gamen, S., et al., *FEBS Lett* 417:360-364 (1997)), welche Topoisomerase II Inhibitoren sind; Cisplatin (Maldonado, V., et al., *Mutat. Res.* 381:67-75 (1997)); Chlorambukil (Hickman, J.A., *Cancer Metastasis Rev.* 11:121-139 (1992)) welches ein Alkylierungsmittel ist; und Fluorouracil, ein RNA/DANN Anti-Metabolit ((Hickman, J.A., *Cancer Metastasis Rev.* 11:121-139 (1992)). Inaktivatoren entweder mittels eines direkten oder indirekten Mechanismus von Enzymen, die in der Apoptose Kaskade involviert sind, umfassen, aber sind nicht limitiert auf endogene Proteine, umfassend Bel-2 (Joensuu, H., et al., *Am. J. Pathol.* 5:1191-1198 (1994)), das viral produzierte Mittel p35 (Miller, L.K., *J. Cell Physiol.* 173: 178-182 (1997)) und der synthetische Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (An, S., and Knox, K.A., *FEBS Lett.* 386:115-122 (1996)).

[0139] Reporterverbindungen mit den Formeln I-IV können verwendet werden in Gesamtzelltests unter Verwendung von lebenden und toten Zellen oder Gewebeproben, um Verbindungen zu screenen, die entweder direkt oder indirekt ein Enzym oder Enzyme, die in der Apoptose (programmierter Zelltod) involviert sind. Von diesen Screeningtests unter Verwendung von Verbindungen mit den Formeln I-IV wird erwartet, dass sie zur Entdeckung von neuen Drogen oder neuen Verwendungen für bekannte Drogen führen, die verlangsamen oder den Zelltod in einer Anzahl von klinischen Konditionen blockieren oder verhindern, bei denen ein Verlust

von Zellen, Geweben oder gesamten Organismen vorkommt.

[0140] Reporterverbindungen mit den Formeln I-IV und die Screeningtests können verwendet werden, um Drogen zu identifizieren, die Zelltod reduzieren oder verhindern im Nervensystem (Hirn, Spinalgang und peripherem Nervensystem) unter verschiedenen Bedingungen von Ischämie und Excitotoxizität, umfassend aber nicht limitiert auf fokale Ischämie zurückzuführen auf Hirnschlag und globale Ischämie zurückzuführen auf Herzstillstand. Die Testverfahren können ebenfalls verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die Zelltod zurückzuführen auf eine traumatische Krankheit (wie ein Kopftrauma oder eine spinale Krankheit) virale Infektion oder strahlungsinduziertem Nerventod (z. B. als ein Seiteneffekt von Krebsradiotherapie) oder Umgebungstoxizität (z. B. bestimmte halogenierte Kohlenwasserstoffe) zu reduzieren oder vorzubeugen. Die Screeningtests können ebenfalls verwendet werden, um Zelltod Inhibitoren zu identifizieren, die nützlich sind, um Zelltod zu reduzieren oder zu verhindern in einem Bereich von neurodegenerativen Störungen, einschließlich aber nicht limitiert auf Alzheimer, Huntington's Krankheit, Parkinson, Multiple Sklerose, Amyotrophische laterale Sklerose und spinobulbare Atrophy.

[0141] Die Screening Verfahren können verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die Zelltod vorbeugen unter jeglicher Bedingung, die möglicherweise im Tod des Herzmuskels resultiert. Dies umfasst myocardialen Infarkt, Herzstillstand und Cardiomyopathy. Eine besondere Anwendung des Screening Verfahrens ist die Identifikation von Verbindungen, die myocardialen Zelltod reduzieren oder verhindern, der Auftritt bei bestimmten viralen Infektionen des Herzens.

[0142] Das Screening Verfahren kann verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die Zelltod vorbeugen von retinalen Neuronen, welcher vorkommt bei Störungen, verbunden mit verstärktem intraokularem Druck (wie Glaukom) oder retinalen Störungen, verbunden mit Alterungsprozessen (wie den alterungsverbundenen makularen Degenerationen). Die Tests können verwendet werden, um Verbindungen zu identifizieren, die vererbte degenerative Störungen der Retina behandeln, wie Retinitis Pigmentosa.

[0143] Die Screening Verfahren können verwendet werden, um Zelltod Inhibitoren zu identifizieren, die verwendet werden können, um einen vorzeitigen Tod von Zellen des Immunsystems vorzubeugen oder zu reduzieren und vorzugsweise nützlich in der Identifikation von Inhibitoren, die verwendet werden können zur Behandlung von Immunschwächestörung, wie das erhaltene Immunschwächesyndrom (AIDS), schwere kombinierte Immunschwächesyndrom (SCIDS) und verbundene Krankheiten. Die Testverfahren können ebenfalls verwendet werden, um Zelltod Inhibitoren zu identifizieren, die verwendet werden zur Behandlung von Strahlen induzierter Immunsuppression.

[0144] Die Screeningtests können ebenfalls verwendet werden um Drogen zu identifizieren, die zur Behandlung von Immuntransplantationsverfahren verwendet werden. Transplantation von menschlichen Organen und Geweben ist eine allgemeine Behandlung von Organversagen. Jedoch während des Transplantationsverfahrens besteht das Risiko, dass das Donor Organ oder Gewebe ein Risiko zum Zelltod hat, da es aus dem normalen Blut entnommen wurde, bevor es dem Empfänger implantiert wurde. Dieser ischämische Zustand kann behandelt werden mit Zelltod Inhibitoren durch Infusion in das Donor Organ oder Gewebe, oder durch direkte Zugabe von Zelltod Inhibitoren zu den Organ/Gewebenahrungsmedium. Solche Zelltodinhibitoren können identifiziert werden unter Verwendung der Screeningtests, wie sie hierin beschrieben sind. Zelltod Inhibitoren können ebenfalls verwendet werden, um Zelltod zu verhindern oder vorzubeugen indem Donor Organ/Gewebe nachdem es transplantiert worden ist, um es vor dem Effekt von Gastimmunzellen zu schützen, die ihre Targets durch Auslösen von Apoptose töten. Die Screeningtests, die hierin beschrieben sind, können verwendet werden, um Zelltod Inhibitoren zu verwenden, die nützlich sind, beim Schutz von transplantierenden Organen vor Abstoßung. Die cytoprotektiven Effekte von Zelltod Inhibitoren können ebenfalls verwendet werden, um Zelltod von humanem oder Tiersperma und Eiern, die in der in vitro Fertilisation verwendet werden, vorzubeugen. Diese Inhibitoren können verwendet werden, während des Erntens und können einbezogen werden in das Lagermedium. Zelltod Inhibitoren, die nützlich sind zur Anwendung bei Fertilisationsverfahren können identifiziert werden, durch die Screening Verfahren, die hierin beschrieben werden.

[0145] Säugetierzelllinien und Hefezellen werden weitgehend verwendet, um große Mengen an rekombinanten Proteinen (wie Antikörper oder Enzyme oder Hormone) für industrielle oder medizinische Zwecke zu produzieren. Die Lebensdauer von einigen dieser Zelllinien ist limitiert aufgrund von Wachstumsbedingungen, die in Natur der rekombinanten Moleküle mit exprimiert (einige sind toxisch) und andere unbekannte Faktoren. Die Lebensspanne von industriellen Zelllinien kann erweitert werden durch Einschluß von Zelltod Inhibitoren in dem Wachstumsmedium. Zelltodinhibitoren, die nützlich sind im Ausdehnen der Lebensspanne können identifiziert werden zur Verwendung der Screening-Test Verfahren, wie sie hierin beschrieben sind.

[0146] Die Faktoren, die das Haarwachstum und Verlust regulieren sind weitgehend unbekannt. Es gibt einige Nachweise, dass die Haar follicle Regression (im folgenden bestimmt als Catagen) auf wenigsten teilweise Apoptose zurückführen kann. Daher ist es möglich, dass Zelltod Inhibitoren verwendet werden können, um Haarverlust zu behandeln, der Eintritt zurückzuführen auf verschiedene Bedingungen, umfassend aber nicht limitierend auf schlechte Behandlung, strahlungsinduzierten oder Chemotherapie-induzierten Haarverlust, und Haarverlust zurückzuführen auf emotionalen Streß. Es gibt ebenfalls Beweise, dass Apoptose eine Rolle spielen kann bei dem Verlust der Haarfarbe. Daher ist es möglich, dass Zelltod Inhibitoren ebenfalls verwendet werden können bei der Behandlung von dem Vorreifestadium des Grauwerdens von Haar. Zelltod Inhibitoren können ebenfalls verwendet werden zum Vorbeugen des Haarverlust oder Grauwerden des Haares und können identifiziert werden unter Verwendung des Screeningverfahrens, wie es hierin beschrieben ist.

[0147] Der Tod von Hautepithelzellen kann vorkommen nach Aussetzen von hohen Strahlendosen, Hitze oder Chemikalien. Es ist möglich, dass Zelltodinhibitoren verwendet werden können, um diesen Typ der Hautschädigung zu reduzieren oder zu verringern. In einer besonderen Anwendung können Zelltod Inhibitoren verwendet werden in einer Salbe, um akute Überbelichtung gegenüber Sonne zu behandeln und um Blasenbildung und Abschälen der Haut zu verhindern. Zelltod Inhibitoren sind nützlich bei der Behandlung oder Verhinderung von Zelltod von Hautzellen und kann identifiziert werden unter Verwendung des Screening Verfahrens wie es hierin beschrieben ist.

[0148] Eine weitere wichtige Verwendung der Reporterverbindungen mit den Formeln I-IV ist der in Gesamtzelltests unter Verwendung von lebenden oder toten Gesamtzellen oder Geweben, um Verbindungen zu screenen, die entweder direkt oder indirekt ein Enzym oder Enzyme in Apoptose involviert sind, stimulieren. Daher können diese Screeningtests unter Verwendung der Verbindung der Formel I-IV verwendet werden und es wird erwartet, dass diese zur Entdeckung von neuen Drogen führen und für neue Verwendungen für bekannte Drogen, die als Anti-Krebs Mittel bei Krankheiten wie Krebs, Tumoren und Zellhyperplasie etc. wirken. Verbindungen die gefunden werden können, unter Verwendung des Screening Verfahrens und Mittel, die hierin beschrieben sind, sind nützlich zur Behandlung von Krebs, Tumoren oder Gewebhyperplasie einschließlich aber nicht limitiert auf Krebs oder Tumore des Gehirns, des peripheren Nervensystems, Auge, Ohr, Nase, Mund, Zunge, Zähne, Esophagus, Lunge, Herz, Blut, Blutgefäße, Knochenmark, Lymphknoten, Thymus, Milz, Immunsystem, Leber, Magen, intestinal Trakt, Pankreas, endokrine Drüsen und Gewebe, Nieren, Blase, reproduktive Organe und Drüsen, Gelenke, Knochen und Haut.

[0149] Eine weitere wichtige Verwendung der Reporterverbindungen mit den Formeln I-VI ist der in Gesamtzelltests und unter Verwendung von Hefen und anderen Fungi und Bakterien, um Verbindungen zu screenen für antifungale oder antibakterielle Drogen, die wirken durch Induzieren direkt oder indirekt der Caspase Kaskade oder anderen Enzymen, die beim Zelltod eine Rolle spielen.

[0150] Ein anderer wichtiger Aspekt der Reporterverbindungen mit den Formeln I-IV ist der, dass man hier die therapeutischen Effekte der therapeutischen Mittel oder Behandlungen die dem Patienten zugeteilt wurden beobachten kann mit dem Ziel des Reduzierens, Vorbeugens oder Behandeln von Krankheiten im Zusammenhang mit apoptotischem Zelltod.

[0151] Ein weiterer wichtiger Aspekt der Reporterverbindungen mit der Formel V ist der des Screenings für HIV Protease Inhibitoren in HIV infizierten Zellen, durch ein Verfahren, umfassend

- (a) Kontaktieren der Testzelle mit der Testsubstanz und der Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Bedingungen, wodurch die Testsubstanz entweder mit einem externen Membranrezeptor interagiert oder in die Zelle genommen wird und die Reporterverbindung ebenfalls in die Zelle genommen wird und
- (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Testzellen, wodurch eine Veränderung der Fluoreszenz der Testzelle, wodurch eine Veränderung der Fluoreszenz entweder in der Größe oder Wellenlänge, innerhalb der Testzelle, verglichen mit einer Kontrollzelle, die nur mit der Reporterverbindung kontaktiert wurde und nicht mit der Testsubstanz, eine Indikation dafür ist, dass die Testsubstanz einen Hemmungseffekt auf die HIV Protease aufweist.

[0152] Eben noch ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Verwendung der Reporterverbindungen mit der Formel V zur Diagnose von HIV Infektionen, umfassend ein Verfahren

- (a) Kontaktieren einer Testzelle von einem Patienten von dem angenommen wird, dass er HIV infiziert ist, mit einer Reporterverbindung gemäß der Erfindung unter Konditionen, wodurch die Reporterverbindung in die Zelle genommen wird, und
- (b) Aufzeichnen der Fluoreszenz der Testzelle, worin eine Veränderung in der Fluoreszenz entweder in der Größe oder der Wellenlänge innerhalb der Testzelle, verglichen mit einer Kontrollzelle, die nicht mit einer

Reporterverbindung kontaktiert wurde, eine Indikation dafür ist, dass die besagte Testzelle durch HIV Virus infiziert wurde und dass der Patient mit HIV infiziert ist.

[0153] Unter Anwendung des gleichen Verfahrens für das Screening von HIV Proteasen Inhibitoren in HIV infizierten Zellen können die Reporterverbindungen mit der Formel V der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um Adenovirus Protease Inhibitoren in Adenovirus infizierten Zellen zu screenen. Die Reporterverbindungen mit der Formel V der vorliegenden Erfindung können ebenfalls verwendet werden, um Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) Protease inhibieren in HSV-1 infizierten Zellen zu screenen. Die Reporterverbindungen können ebenfalls verwendet werden, um humanes Cytomegalovirus (HCMV) Protease Inhibitoren in HCMV infizierten Zellen zu screenen, um Hepatitis C Virus (HCV) Protease Inhibitoren in HCV infizierten Zellen zu screenen; als auch Typ 2 Methionin Aminopeptidase (MetAP-2) Inhibitoren in endothelialen Zellen zu screenen.

[0154] Ergänzend kann das gleiche Verfahren für die Diagnose von HIV Infektion verwendet werden, wobei die Reporterverbindungen mit der Formel V der vorliegenden Erfindung verwendet werden können für die Diagnose von Adenovirus, Herpes Simplex Virus Typ 1, humanes Cytomegalovirus und Hepatitis C Virus.

[0155] Die fluorogenen oder fluoreszierenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung können verwendet werden in Zusammensetzungen, in denen sie enthalten sind in Mengen, die effektiv sind, um den gewollten Zweck zu erzielen. Während die Mengen variieren können von Test zu Test kann die Festlegung der optimalen Bereiche der effektiven Mengen für jede Komponente innerhalb des Fachwissens des Fachmanns liegen. Typischerweise können die fluorogenen oder fluoreszierenden Substrate verwendet werden bei Zellen oder Zelllinien von Säugetieren, z. B. Menschen oder anderen Tieren durch Inkubation von Zellen oder Geweben, die die Zellen enthalten mit der fluorogenen oder fluoreszierenden Substanz mit einer Konzentration von etwa 0,01 nanomolar bis etwa 1 molar, oder einer äquivalenten Menge eines Salzes oder eines Pro-Reportermoleküls davon in einem physiologisch kompatiblen Puffer. Solche Puffer umfassen zelluläre Wachstumsmedien, wie z. B. für Leukämie abgeleitete Krebszellen, welche RPMI-1640 mit oder ohne 10% fetalem Rinderserum sind. Andere bekannte Zelleninkubationspuffer können isotonische Lösungen umfassen, gepuffert mit entweder Phosphat oder HEPES. Der Fachmann kann andere geeignete Puffer identifizieren, dies ist nur eine Routine-tätigkeit. Die Zellen können erhalten werden von jeglichem Organ oder Organsystem für das es wünschenswert ist die Screeningtests zu finden. Sie können nützlich sein bei der Behandlung von Apoptose begleitenden Krankheiten wie z. B. neuralem Zelltod, Herzkrankheiten, Leberkrankheiten, retinalen Störungen, Nieren-, Gelenken-, Knochenkrankheiten sowie Immunsystemkrankheiten, Krebs, Tumoren und Gewebehyperplasien etc.

[0156] Einige Lösungsvermittler können verwendet werden zum Darstellen der fluorogenen oder fluoreszierenden Verbindungen der vorliegenden Erfindung gegenüber Zellen oder Zelllinien. Geeignete Lösungsmittel umfassen wässrige Lösungen der aktiven Verbindungen in wasserlöslicher Form, z. B. wasserlösliche Salze und alkalische Lösungen. Zusätzlich können den Zellen Suspensionen der Verbindungen als geeignete Ölsuspensionen präsentiert werden. Geeignete lipophile Lösungsmittel oder Vehikel umfassen Fettsäuren, z. B. Sesamöl oder synthetische Fettsäureester, z. B. Ethyloleat oder Triglyceride oder Polyethylen Glykol-400 (die Verbindungen sind löslich in PEG-400) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) oder andere geeignete Lösungsmittel. Optional kann diese Suspension oder die Lösung ebenfalls Stabilisierungsmittel enthalten. Optional kann die Präsentation des Reportermoleküls in Liposomen oder Detergenzien verwendet werden, um die Zellpermeabilität der fluorogenen oder fluoreszierenden Reportermoleküle zu steigern.

[0157] Typischerweise werden die Zellen mit den Reporterverbindungen der Erfindung und die Testsubstanzen für etwa 30 Minuten bis etwa 5 Stunden, vorzugsweise etwa 1 Stunde kontaktiert. Die Erfindung betrifft ebenfalls Pro-Reporterderivate der Verbindungen der Erfindung. Solche Pro-Reporterderivate umfassen Verbindungen, die gespalten werden in situ durch endogene Enzyme, um die Verbindungen der Formel II bis V zu ergeben. Solche Pro-Reporterderivate umfassen niedrige Alkylester von Carboxyl enthaltenden Aminosäureresten wie Asp und Glu. Besonders bevorzugte Pro-Reporterderivate umfassen Methyl oder Ethylester und Acetomethyl (AM) oder Pivaloyloxymethylester von Asp- und Glycyl enthaltenden Verbindungen.

[0158] Die folgenden Beispiele zeigen die Nützlichkeit der Verbindungen der Erfindung beim Messen der Aktivität der Caspasen und anderen Enzymen, die bei der Apoptose in Zellen und Geweben mit eingeschlossen sind. Die Beispiele zeigen ebenfalls die Nützlichkeit der Verbindungen der Erfindung beim Drogen Screening, das verwendet werden kann um Verstärker oder Inhibitoren von Apoptose zu finden. Diese Beispiele sind illustrativ aber sie limitieren nicht das Verfahren und die Verbindungen der vorliegenden Erfindung. Andere geeignete Modifikationen und Adaptionen und Anpassungen der Konditionen und Parameter, die normalerweise bei in vitro Tests vorkommen, Drogen Screening Verfahren oder diagnostische Verfahren sind für den Fach-

mann bekannt.

Beispiel 1

N-Pentafluorobenzoyl-Rhodamin 100

[0159] Zu einer Lösung von Rhodamin 100 (1500 mg, 4,1 mmol) in Dimethylformamid (40 ml) bei -42°C wurden N,N-Diisopropylethylamin (635,5 mg, 4,9 mmol) hinzugegeben. Dann wurde Pentafluorobenzoyl Chlorid (1131 mg, 4,9 mmol) tropfenweise zu der obigen Lösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 10 Min. bei -42°C gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden beim Rühren gehalten. Sie wurde mit 200ml Eiswasser verdünnt und extrahiert mit Ethylacetat (3×50 ml). Die organische Phase wurde mit Salzwasser gewaschen (3×50 ml), über Na_2SO_4 getrocknet und konzentriert, um ein Rohrprodukt zu ergeben, welches mittels Säulen Chromatographie gereinigt wurde (Hexan/EtOAc 1:1) und ergab 421 mg (20%) der Titelverbindung als ein farbloser Feststoff. $R_f = 0,66$ (EtOAc/Hexan = 1:1). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 8,00 (d, J = 8,1 Hz), 7,81 (s, 1H), 7,71-7,59 (m, 3H), 7,16 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 7,01 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 6,76 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 6,55 (s, 1H), 6,36 (m, 1H), 3,93 (bs, 2H).

Beispiel 2

N-[Z-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110

[0160] Zu einer Lösung von Z-Val-Asp(OBut) (103 mg, 0,25 mmol) aufgelöst in einer wasserfreien 1:1 Mischung von Dimethylformamid und Pyridin (1ml) bei 0°C wurden EDC (47 mg, 0,25 mmol) hinzugegeben und die Lösung wurde gerührt für 20 Min., dann wurde eine Lösung von N-Pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110 (25 mg, 0,047 mmol) in dem gleichen Lösungsmittel (1 ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann bei Raumtemperatur während 5 Tagen gerührt und dann verdünnt mit 100 ml Wasser und extrahiert mit Ethylacetat (3×50 ml). Die organische Phase wurde gewaschen mit 1N HCl (3×30 ml) und Wasser (2×50 ml). Die Lösung wurde über Na_2SO_4 getrocknet und konzentriert, um ein Rohprodukt zu ergeben, welches durch Säulen Chromatographie gereinigt wurde (EtOAc/ CH_2Cl_2 0 1:8) und ergab 20 mg (46%) der Titelverbindung als Feststoff. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 9,02 (bs, 1H), 8,90 (bs, 1H), 8,01(bs, 1H), 7,80(bs, 1H), 7,70-7,50 (m, 4H), 7,31 (m, 5H), 7,22-7,10 (m, 2H), 6,806,75(m, 2H), 5,30 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 5,00 (bs, 1H), 4,04 (bs, 1H), 3,73 (1H), 3,45 (bs, 1H), 3,12 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,15-1,05 (m, 6H).

Beispiel 3

N-(Z-Val-Asp)-N'-pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110

[0161] Zu einer gekühlten Lösung (0°C) von N-(Z-Val-Asp)-N'-pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110 (17 mg, 0,018 mmol) in Methylchlorid (1 ml) wurden 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (2 ml) gegeben, die Lösungen wandelte sich um in orange und wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohrprodukt wurde gereinigt durch eine schnelle Säulen Chromatographie um 15 mg (96%) der Titelverbindung zu ergeben. $R_f = 0,45$ (10 ml EtOAc mit 5 Tropfen $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): 8,02 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,82-7,70 (m, 3H), 7,40-7,20 (m, 8H), 6,82 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,72-6,62 (m, 1H), 5,11(m, 2H), 3,90 (d, 2H), 3,79 (d, 2H), 3,18-3,00 (m, 1H), 2,96-2,78 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,05-0,98 (m, 6H).

Beispiel 4

N-(Z-Glyl-N'-pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110

[0162] Aus Z-L-Gly (523 mg, 2,5 mmol), EDC (479 mg, 2,5 mmol) und N-pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110 (131 mg, 0,25 mmol) wurde 151 mg (84%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 8,82 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,68-7,60 (m, 2H), 7,38 (s, 1H), 7,32 (m, 6H), 7,16 (m, 1H), 7,08 (m, 1H), 6,68-6,60 (m, 2H), 6,00 (bs, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,04 (bs, 2H).

Beispiel 5

N-Glyl-N'-pentafluorobenzoyl-Rhodamin 110

[0163] Zu einer gekühlten (0°C) Lösung von 30% HBr in Essigsäure (1ml) wurden (N-(Z-Glyl)-N'-pentafluor-

benzoyl-Rhodamin 110 (30 mg, 0,042 mmol) gegeben, die Lösung wurde dann auf Raumtemperatur erwärmt und für 1 Stunde gerührt, nach Konzentration unter Vakuum wurde Ether (20ml) hinzugefügt, um das Produkt zu präzipitieren. Das filtrierte Pulver wurde mit Ether gewaschen und getrocknet um 22 mg (81%) der Titelverbindung zu ergeben. ^1H NMR (DMSO): 11,32 (s, 1H), 10,71 (s, 1H), 8,09 (s, 3H), 8,04 (bs, 1H), 8,02 (bs, 1H), 7,83-7,70 (m, 3H), 7,30 (d, $J = 8,1\text{Hz}$, 1H), 7,21-7,16 (m, 2H), 6,87-6,81 (t, 2H), 3,81(d, $J = 4,8\text{Hz}$, 2H).

Beispiel 6

N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0164] Von Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (SEQ ID NO:5) (178 mg, 0,023 mmol), ED (44 mg, 0,23 mmol) und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (30 mg, 0,057 mmol) wurden 28 mg (38% der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. ^1H NMR (CDCl_3): 9,10-8,18 (m, 2H), 8,05-8,04 (m, 7H), 7,40-7,22 (m, 5H), 7,22-7,05 (m, 1H), 6,85-6,65 (m, 2H), 6,20-6,00 (m, 1H), 5,15 (d, 1H), 4,90 (d, 1H), 4,58 (t, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,10-2,65 (m, 6H), 2,45 (m, 2H), 2,10 (m, 1H), 1,50-1,38 (m, 27H), 1,10-0,95 (m, 6H).

Beispiel 7

N-(Z-Asp-Glu-Val-Asp)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0165] Aus N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl (SEQ ID NO:5) Rhodamin 110 (19 mg, 0,015 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (2 ml) wurden 16,5 mg (100%) der Titelverbindung erhalten. $R_f = 0,46$ (10 ml EtOAc mit 5 Tropfen $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). ^1H NMR (CD_3OD): 8,40-7,65 (m, 7H), 7,45-7,10 (m, 6H), 6,92-6,72 (m, 2H), 5,08 (m, 2H), 4,48-4,35 (m, 2H), 4,07 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,15-2,70 (m, 6H), 2,37 (m, 2H), 2,02(m, 1H), 1,05-0,97 (m, 6H).

Beispiel 8

N-1Z-Val-Asp(Obut)-Glyl-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0166] Aus Z-Val-Asp(OBut) (52,1 mg, 0,12 mmol), EDC (24 mg, 0,12 mmol) und N-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (16 mg, 0,025 mmol) wurden 12,7 mg (52% der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. ^1H NMR (CDCl_3): 8,30-7,60 (m, 6H), 7,34 (m, 5H), 7,28-7,05 (m, 2H), 6,90-6,65 (m, 2H), 5,38 (m, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,95-4,70 (m, 1H), 4,02 (bs, 1H), 3,05-2,70 (m, 2H), 2,18 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,05-0,95 (m, 6H).

Beispiel 9

N-(Z-Val-Asp-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0167] Aus N-[Z-Val-Asp(OBut)-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (12 mg, 0,012 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (2ml) wurden 11,2 mg (100%) der Titelverbindung erhalten. $R_f = 0,4$ (10 ml EtOAc mit 2 Tropfen $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). ^1H NMR (Acetone- d_6): 10,42 (s, 1H), 9,62 (bs, 1H), 8,85 (bs, 1H), 8,10-7,92 (m, 2H), 7,88-7,70 (m, 2H), 7,50-7,12 (m, 10H), 6,91-6,86 (m, 1H), 6,76 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, 1H), 5,15 (m, 2H), 4,85 (m, 1H), 4,00 (bs, 1H), 3,20-2,90 (m, 2H), 2,22 (bs, 1H), 0,95 (bs, 6H).

Beispiel 10

N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)-Glyl-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0168] Aus Z-Asp-(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)(SEQ ID NO:5) (86,8 mg, 0,11 mmol), i-Pr₂NEt (0,2 ml), EDC (21,4 mg, 0,1 mmol) and N-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr (18 mg, 0,028 mmol) wurden 29 mg (78%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. $R_f = 0,66$ (EtOAc/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1$). ^1H NMR(CDCl_3): 10,31 (s, 1H), 9,11 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 8,05-7,42 (m, 8H), 7,37-7,35 (m, 5H), 6,98-6,80 (m, 2H), 5,12 (t, 2H), 4,55 (bs, 2H), 4,30 (bs, 1H), 4,15-3,85 (m, 2H), 3,05-2,70 (m, 2H), 2,30 (m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,41 (m, 27H), 1,00 (m, 6H).

Beispiel 11

N-(Z-Asp-Glu-Val-Asp-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 76)

[0169] Aus N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl (SEQ ID NO:76) Rhodamin 110 (11 mg, 0,008 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (1 ml) wurden 8,5 mg (91%) der Titelverbindung erhalten. ^1H NMR (Acetone- d_6): 10,34 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 9,12 (s, 1H), 8,05-7,42 (m, 8H), 7,34 (m, 5H), 7,00-6,77 (m, 2H), 5,09 (m, 2H), 4,62 (m, 1H), 4,60 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 4,18-4,00 (m, 2H), 3,02-2,84 (m, 2H), 2,40 (m, 2H), 2,22 (m, 1H), 0,98 (m, 6H).

Beispiel 12

N-[Boc-Met-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0170] Aus Boc-Met (15,4 mg, 0,062 mmol), EDC (11,9 mg, 0,062 mmol), i-Pr₂NEt (0,1 ml) and N-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr (10 mg, 0,016 mmol) wurden 7,8 mg (62%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. R_f = 0,65 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 1:1), ^1H NMR (CDCl₃): 8,96 (bs, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,98 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,70-7,56 (m, 3H), 7,34-7,10 (m, 5H), 6,69 (m, 2H), 5,42 (bs, 1H), 4,30-4,20 (m, 1H), 4,20-4,12 (m, 2H), 2,59 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,10 (m, 2H), 1,41 (s, 9H).

Beispiel 13

N-(Met-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110. CF₃CO₂H

[0171] Aus N-[Boc-Met-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (6,8 mg, 0,0084 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (1 ml) wurden 4,7 mg (69%) der Titelverbindung erhalten. ^1H NMR (CD₃OD): 8,05-7,69 (m, 5H), 7,26-7,14 (m, 3H), 6,84-6,73 (m, 2H), 4,11 (m, 3H), 2,69 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,30-2,10 (m, 2H), 2,17 (s, 3H).

Beispiel 14

N-(Z-Phe)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0172] Aus Z-Phe (120 mg, 0,40 mmol), EDC (77 mg, 0,40 mmol) and N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (70 mg, 0,13 mmol) wurden 101 mg (74%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. ^1H NMR (CDCl₃): 8,78-8,73 (m, 2H), 7,96 (bs, 1H), 7,66 (bs, 2H), 7,42-7,03 (m, 14H), 6,94 (m, 1H), 6,65-6,54 (m, 2H), 5,98 (d, 2H), 5,11-4,96 (m, 2H), 4,68 (bs, 1H), 3,23-3,05 (m, 2H).

Beispiel 15

N-Phe-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr

[0173] Aus N-(Z-Phe)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (70 mg, 0,087 mmol) und 30% HBr in Essigsäure (1 mg) wurden 65 mg (99%) des Titelprodukts erhalten. R_f = 0,4 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 1:1). ^1H NMR (CD₃OD): 8,05 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,82-7,71 (m, 3H), 7,40-7,28 (m, 5H), 7,26-7,08 (m, 3H), 6,85-6,75 (m, 2H), 4,22 (t, J = 6,9 Hz, 1H), 3,20-3,13 (m, 2H).

Beispiel 16

N-[Boc-Ala-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0174] Aus Boc-Ala-Gly (28,2 mg, 0,115 mmol), EDC (21,9 mg, 0,115 mmol) und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (20 mg, 0,038 mmol) wurden 26 mg (91%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. R_f = 0,43 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 1:1). ^1H NMR (CDCl₃): 8,98(s, 1H), 8,45 (s, 1H), 8,00 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,70-7,60 (m, 4H), 7,42-7,10 (m, 4H), 6,70(m, 2H), 5,12 (bs, 1H), 4,11 (bs, 1H), 1,41 (s, 9H).

Beispiel 17

N-(Ala-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110. CF₃CO₂H

[0175] Aus N-[Boc-Ala-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (10 mg, 0.013 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid wurden 8,1 mg (81 %) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,04 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,94 (d, 1H), 7,83-7,73 (m, 3H), 7,25-7,16 (m, 3H), 6,84-6,74 (m, 2H), 4,10 (d, 2H), 4,03 (m, 1H), 1,57 (d, J = 6,9Hz, 3H).

Beispiel 18

N-[Z-Gly-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0176] Aus Z-Gly-Gly (40,7 mg, 0,153 mmol), EDC (29,3 mg, 0,153 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (40 mg, 0.076 mmol) wurden 56 mg (95%) der Titelverbindung erhalten. R_f = 0,38 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 2:1). ¹H NMR (CDCl₃): 8,95 (bs, 1H), 8,53 (bs, 1H), 7,96 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,68-7,60 (m, 3H), 7,53 (s, 1H), 7,35-7,27 (m, 7H), 7,20-7,08 (m, 2H), 6,69-6,62 (m, 2H), 5,73 (bs, 1H), 5,06 (s, 2H), 4,07 (d, 2H), 3,87 (d, 2H).

Beispiel 19

N-(Gly-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-)Rhodamin 110 HBr

[0177] Aus N-[Z-Gly-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (40 mg, 0,052mmol) und 30% HBr in Essigsäure (1 mL) wurden 32 mg (86%) des Titelprodukts erhalten. ¹H NMR (CD₃OD): 8,04 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,93 (bs, 1H), 7,83 (d, 1H), 7,82-7,70 (m, 2H), 7,25-7,17 (m, 3H), 6,84-6,74 (m, 2H), 4,23 (s, 2H), 3,80 (m, 2H).

Beispiel 20

N-[Z-Gly-Pro]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0178] Aus Z-Gly-Pro (35,0 mg, 0,114 mmol), EDC (21,9 mg, 0,114 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (20 mg, 0,038 mmol) wurden 28 mg (91 %) des Titelsprodukt als ein Feststoff erhalten. R_f = 0,48 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 2:1). ¹H NMR (CDCl₃): 9,55 (s, 1H), 8,27 (bs, 1H), 8,00 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,70-6,98 (m, 12H), 6,73-6,62 (m, 2H), 5,63 (bs, 1H), 5,10 (bs, 2H), 4,72 (bs, 1H), 4,04 (m, 2H), 3,60 (bs, 1H), 4,68(m, 1H), 2,42 (bs, 1H), 2,18-1,95(m, 3H).

Beispiel 21

N-(Gly-Pro)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr

[0179] Aus N-[Z-Gly-Pro]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (20 mg, 0,025 mmol) und 30% HBr in Essigsäure (1 ml) wurden 17 mg (89%) des Titelprodukts erhalten. ¹H NMR (CD₃OD): 8,04 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,94 (d, 1H), 7,83-7,70 (m, 3H), 7,25-7,15 (m, 3H), 6,84-6,74 (m, 2H), 4,60(m, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,72-3,58 (m, 2H), 2,40-2,04 (m, 4H).

Beispiel 22

N-[Boc-Met-Gly-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0180] Aus Boc-Met (10,4 mg, 0,042 mmol), EDC (7,9 mg, 0,042 mmol) und N-Gly-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr (15 mg, 0,021) wurden 14 mg (70 %) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. R_f = 0,27 (EtOAc), ¹H NMR (CDCl₃): 8,83 (bs, 1H), 8,42 (1H), 7,99 (d, J = 6,9 Hz, 1H), 7,70-7,13 (m, 7H), 6,72 (m, 2H), 5,50 (bs, 1H), 4,25-3,80 (m, 5H), 2,59 (bs, 2H), 2,20-1,95 (m, 5H), 1,37 (s, 9H).

Beispiel 23

N-(Met-Gly-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr

[0181] Aus N-[Boc-Met-Gly-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (11 mg, 0,012 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylchlorid (0.5 ml) wurden 8,2 mg (81%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,04

(d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,94-7,70 (m, 4H), 7,25-7,19 (m, 3H), 6,84-6,74 (m, 2H), 4,07 (s, 1H), 4,04 (s, 1H), 2,64 (t, J = 8,1 Hz, 2H), 2,22-2,10 (m, 5H).

Beispiel 24

N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-(2,4 bis(dodecanemercapto)-3,5,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0182] Eine Mischung von Z-N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin (SEQ ID NO:5) 110 (8 mg, 0,0062 mmol), 1-Dodekanthiol (6,3 mg, 0,031 mmol), Diisopropylethylamin (4mg, 0,031 mmol) in DMF (0,3 ml) wurde gerührt bei Raumtemperatur für 24 Stunden, Dünnschichtchromatographie zeigte, dass die Reaktion vervollständigt war. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser geschüttet (10 ml) und extrahiert mit EtOAc (3 × 10 ml). Die organische Phase wurde gewaschen mit 1N HCl (2 × 10 ml) und Wasser (2 × 10 ml). Die Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet und konzentriert und gab ein Rohprodukt, welches gereinigt wurde mittels Säulenchromatographie (EtOAc/Hexan 1:3) um 8,4 mg (82%) der Titelverbindung als eine Feststoff zu ergeben. R_f = 0,93 (EtOAc/Hexan 1:1). ¹H NMR (CDCl₃): 9,10-8,78 (m, 1H), 8,34-8,18 (m, 1H), 8,01 (d, J = 6,6 Hz, 3H), 7,84-7,10 (m, 12H), 6,82-6,70 (m, 2H), 6,15-6,00 (m, 1H), 5,10-4,80 (m, 3H), 4,60-3,84 (m, 3H), 3,20-2,70 (m, 10H), 2,52 (bs, 2H), 1,56-1,22 (m, 67H), 1,01 (t, J = 6,6 Hz, 6H), 0,92-0,85 (m, 6H).

Beispiel 25

N-(Z-Asp-Glu-Val-Asp)-N'-(2,4-bis(dodecanemercapto)-3,5,6 trifluorbenzoyl)Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0183] Aus N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-(2,4-bis(dodecanemercapto)-3,5,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin (SEQ ID NO:5) 110 (6,1 mg, 0,0037 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (0,8 ml) wurden 4,8 mg (84%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,16-7,68 (m, 7H), 7,42-7,16 (m, 6H), 6,82-6,73 (m, 2H), 5,06 (d, 2H), 4,50-3,92 (m, 4H), 3,20-2,72 (m, 8H), 2,37 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 1,54-1,20 (m, 67H), 1,06-0,96 (m, 6H), 0,93-0,85 (m, 6H).

Beispiel 26

N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)-Gly-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:75)

[0184] Aus Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (SEQ ID NO:75) (34,7 mg, 0,045 mmol), EDC (8,53 mg, 0,045 mmol), und N-Gly-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr (8 mg, 0,011 mmol) wurden 8 mg (49%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. R_f = 0,27 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 2:1), ¹H NMR (CDCl₃): 8,77 (m, 1H), 8,64-8,14 (m, 2H), 8,03-7,10 (m, 13H), 6,80-6,70 (m, 2H), 6,22-5,98 (m, 1H), 5,15 (m, 2H), 4,78-3,76 (m, 8H), 3,00-2,74 (m, 4H), 2,60-2,32 (m, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,45-1,27 (m, 27H), 0,97-0,90 (m, 6H).

Beispiel 27

N-(Z-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 75)

[0185] Aus N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)-Gly-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:75) (6,6 mg, 0,0045 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (0,5 ml) wurden 5,4 mg (98%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,16-7,68 (m, 7H), 7,37-7,20 (m, 6H), 6,83-6,73 (q, 2H), 5,07 (s, 2H), 4,69-4,85 (m, 8H), 2,92;-2,70 (m, 4H), 2,42 (bs, 2H), 2,08 (bs, 2H), 1,30 (s, 1H), 1,02-0,91 (m, 6H).

Beispiel 28

N-(Asp-Glu-Val-Asp)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 HBr (SEQ ID NO:5)

[0186] Aus N-[Z-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin (SEQ ID NO:5) 110 (9,8 mg, 0,0076 mmol) und 30% HBr in Essigsäure (1 ml) wurde 7,1 mg (92%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD): 8,08-7,72 (m, 10H), 4,42 (m, 1H), 4,21 (m, 1H), 3,09-2,83 (m, 4H), 2,42 (m, 2H), 2,10 (m, 2H), 1,30 (bs, 1H), 1,01 (m, 6H).

Beispiel 29

N-[Ac-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0187] Aus Ac-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (SEQ ID NO:5) (206,1 mg, 0,3 mmol), EDC (57,5 mg, 0,3 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (52 mg, 0,1 mmol) wurde 63 mg (53%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. $R_f = 0,43$ (EtOAc/CH₂Cl₂ = 1:1), ¹H NMR (CDCl₃): 9,80-9,06 (m, 1H), 8,82-8,42 (m, 1H), 8,03-6,64 (m, 10H), 5,00-3,90 (m, 4H), 3,22-2,42 (m, 6H), 2,30-2,00 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,49-1,35 (m, 27H), 1,11-1,00 (m, 6H).

Beispiel 30

N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0188] Aus N-[Ac-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin (SEQ ID NO:5) 110 (40 mg, 0,034 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylchlorid (1 ml) wurde 31 mg (89%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,08-7,68 (m, 8H), 6,83-6,74 (m, 2H), 4,70-4,65 (m, 1H), 4,42-4,30 (m, 1H), 4,12-4,04 (m, 1H), 3,98-3,92 (m, 1H), 3,08-2,72 (m, 4H), 2,38 (m, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,98-1,94 (t, 3H), 1,30 (s, 1H), 1,04-0,96 (m, 6H).

Beispiel 31

N-(4-Dodecanemercapto-2,3,5,6-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (I) und N-(2,4-Bis(dodecanemercapto)-3,5,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (ID)

[0189] Eine Mischung von N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (26,2 mg, 0,05 mmol), 1-Dodekanthiol (12,1 mg, 0,06 mmol), Diisopropylethylamin (8,4 mg, 0,065 mmol) in Dimethylformamid (2 ml) wurde gerührt bei 25°C für 16 Stunden. Dünnschichtchromatographie zeigte, dass die Reaktion vervollständigt war. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt (10 ml), extrahiert mit EtOAc (3 × 10 ml) gewaschen mit (3 × 10 ml). Die Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet und konzentriert um ein Rohprodukt zu ergeben, welches gereinigt wurde mittels Säulenchromatographie (EtOAc/Hexan 1:2) und 8,4 mg (82%) ergab zwei Verbindungen. Verbindung I 1,15 mg (42%), $R_f = 0,59$ (EtOAc/Hexan = 1:1). ¹H NMR (CDCl₃): 8,01-7,59 (m, 6H), 7,15 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,74 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 6,54-6,32 (m, 2H), 3,93 (s, 2H), 2,89 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,23 (bs, 18H), 0,88 (t, J = 6,0 Hz, 3H), Verbindung ID, 2,5 mg (5,6%), $R_f = 0,76$ (EtOAc/Hexan = 1:1), ¹H NMR (CDCl₃): 8,007,58 (m, 6H), 7,18-6,39 (m, 5H), 3,93 (s, 2H), 2,95 (bs, 2H), 2,86 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,58 (s, 4H), 1,62-1,50 (m, 4H), 1,38-1,20 (m, 36H), 0,88 (t, J = 0,57 Hz, 6H).

Beispiel 32

N-[Z-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0190] Aus Z-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (92 mg, 0,15 mmol), EDC (29 mg, 0,15 mmol), and N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (20 mg, 0,038 mmol) wurde 34 mg (79%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 8,80 (bs, 1H), 8,36 (bs, 1H), 7,99 (d, 1H, J=3,3 Hz), 7,83 (bs, 1H), 7,80 (bs, 1H), 7,63 (m, 4 H), 7,43 (m, 6H), 7,30 (m, 5H), 5,08 (s, 2H), 4,64 (m, 1H), 4,03 (m, 2H), 2,31 (m, 2H), 2,23 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 1,41 (s, 18H), 0,95 (m, 6H).

Beispiel 33

N-(Z-Glu-Val-Asp)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0191] Aus N-[Z-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (34 mg, 0,03 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylchlorid (2 ml) wurden 23 mg (76%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (Aceton-d₆): 10,32 (bs, 1 H), 9,14 (bs, 1 H), 8,25 (bs, 1 H), 8,13 (bs, 1H), 8,03 (m, 3H), 7,78 (m, 3H), 7,46 (m, 2H), 6,89 (d, 1H, J=9 Hz), 6,78 (dd, 1H, J=8,4, 3,9 Hz), 5,06 (s, 2H), 4,65 (m, 1H), 4,17 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 2,98 (m, 2H), 2,38 (m, 2H), 1,97 (m, 3H), 0,97 (d, 6H, J=6 Hz).

Beispiel 34

N-[Z-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)-Gly]-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:71)

[0192] Aus Z-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (57 mg, 0,09 mmol), EDC (17,8 mg, 0,09 mmol), und N-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (15 mg, 0,023 mmol) wurden 13 mg (45%) der Titelverbindung (13 mg) als ein Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 8,61 (bs, 1H), 7,97 (bs, 1H), 7,94 (d, 1H, J=0,6 Hz), 7,75 (d, 1H, J=2,4 Hz), 7,63 (m, 3H), 7,33 (s, 5H), 7,13 (d, 1H, J=6,9 Hz), 7,14 (dd, 1H, J=8,4, 1,8 Hz), 6,65 (d, 1H, J=8,4 Hz), 6,48 (m, 2H), 6,32 (dd, 1H, J=8,4, 2,1 Hz), 5,09 (s, 2H), 4,46 (m, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,99 (s, 2H), 2,41 (m, 2H), 2,16 (m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,43 (s, 18H), 0,92 (m, 6H).

Beispiel 35

N-(Boc-Leu-Met)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin a 10

[0193] Aus Boc-Leu-Met (96 mg, 0,27 mmol), EDC (51,3 mg, 0,27 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (30 mg, 0,053 mmol) wurden 26 mg (56%) der Titelverbindung (26 mg) als ein Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 9,02 (bs, 1H), 8,25 (bs, 1H), 8,23 (bs, 1H), 8,13 (bs, 1H), 8,00 (d, 1H, J=6,6 Hz), 7,65 (m, 3H), 7,38 (m, 3H), 7,15 (m, 1H), 7,13 (m, 2H), 4,78 (m, 1H), 4,06 (m, 1H), 2,63 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 1,71 (m, 2H), 1,59 (s, 9H), 1,53 (m, 2H), 1,45 (d, 3H, J=3 Hz), 1,39 (d, 3H, J=3,3 Hz).

Beispiel 36

N-(Boc-Met)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0194] Aus Boc-Met (111 mg, 0,44 mmol), EDC (85,4 mg, 0,44 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (25 mg, 0,045 mmol) wurde 33 mg (92%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (acetone-d₆): 9,33 (bs, 1H), 8,92 (bs, 1H), 8,59 (bs, 1H), 7,95 (m, 1H), 7,65 (m, 3H), 7,33 (m, 2H), 7,07 (m, 2H), 6,71 (dd, 1H, J=8,55, 6,6 Hz), 6,59 (dd, 1H, J=20,4 Hz, 8,4 Hz), 4,48 (m, 1H), 2,62 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 1,85 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

Beispiel 37

N-Met-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0195] Aus N-(Boc-Met)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (5 mg, 1,0066 mmol) und Trifluoressigsäure (1 ml) wurden 2 mg (46%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. ¹H NMR (acetone-d₆): 10,41 (bs, 1H), 8,02 (bs, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,78 (m, 3H), 7,34 (m, 4H), 6,88 (m, 3H), 5,4 (bs, 2H), 2,74 (m, 2H), 2,49 (m, 2H), 2,07 (s, 3H).

Beispiel 38

N-(Z-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0196] Aus Z-Ala (100 mg, 0,45 mmol), EDC (86 mg, 0,45 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (25 mg, 0,045 mmol) wurden 24 mg (69%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. (¹H NMR (acetone-d₆): 9,24 (bd, 1H, J=20,7 Hz), 8,89 (bs, 1H), 8,63 (bd, 1H, J=25,2 Hz), 7,96 (m, 1H), 7,65 (m, 3H), 7,28 (m, 5H), 7,09 (m, 3H), 6,83 (s, 1H), 6,60 (m, 2H), 5,12 (m, 2H), 4,55 (m, 1H), 1,47 (d, 3H, J=5,7 Hz).

Beispiel 39

N-Ala-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0197] Aus N-(Z-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (10 mg, 0,013 mmol) und 30% Bromwasserstoff in Essigsäure (1 ml) wurden 8 mg (90%) der Titelverbindung als ein brauner Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 8,81 (bs, 1H), 8,32 (bs, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,97 (dd, 1H, J=7,2, 1,2 Hz), 7,95 (d, 1H, J=2,4 Hz), 7,64 (m, 2H), 7,14 (d, 1H, J=6 Hz), 7,05 (dd, 1H, J=8,7, 2,1 Hz), 6,69 (d, 1H, J=8,4 Hz), 6,47 (m, 2H), 4,45 (bs, 2H), 4,21 (m, 1H), 0,93 (m, 3H).

Beispiel 40

N-(Z-Ala-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0198] Aus Z-Ala-Ala (262 mg, 0,9 mmol), EDC (172 mg, 0,9 mmol), und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (50 mg, 0,09 mmol) wurde 32 mg (49%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 9,44 (bs, 1H), 9,21 (bs, 1H), 8,85 (bs, 1H), 8,78 (bs, 1H), 7,98 (d, 1H, J=6,5 Hz), 7,63 (m, 3H), 7,28 (m, 5H), 7,19 (m, 4H), 6,62 (m, 2H), 5,08 (s, 2H), 4,71 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 1,37 (m, 6H).

Beispiel 41

N-(Ala-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0199] Aus N-(Z-Ala-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (25 mg, 0,033 mmol) und 30% Bromwasserstoff in Essigsäure (1 ml) wurden 21 mg (93%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 8,84 (bs, 1H), 8,79 (bs, 1H), 8,65 (bs, 1H), 7,99 (d, 1H, J=7,2 Hz), 7,66 (m, 3H), 7,20 (m, 4H), 6,77 (m, 2H), 5,25 (m, 1H), 3,79 (m, 1H), 1,67 (bs, 2H), 1,43 (m, 6H).

Beispiel 42

N-(Z-Ala-Ala-Ala-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 77)

[0200] Aus Z-Ala-Ala (79 mg, 0,27 mmol), EDC (52 mg, 0,27 mmol), und N-(Ala-Ala)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (18 mg, 0,027 mmol) wurden 16 mg (61%) der Titelverbindung als ein Feststoff erhalten. ¹H NMR (acetone-d₆): 10,42 (bs, 1H), 9,43 (bs, 1H), 8,10 (bs, 1H), 8,04 (dd, 1H, J=5,1, 1,8 Hz), 8,00 (d, 1H, J=4,8 Hz), 7,77 (m, 4 H), 7,50 (d, 1H, J=8,4 Hz), 7,46 (d, 1H, J=8,4 Hz), 7,35 (m, 5H), 6,88 (d, 1H, J=8,4 Hz), 6,78 (dd, 1H, J=8,7, 2,1Hz), 5,08 (m, 2H), 4,50 (m, 2H), 4,21 (m, 2H), 1,39 (m, 12H).

Beispiel 43

N-(Z-Arg-Gly)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110

[0201] Aus Z-Arg (216 mg, 0,7 mmol), EDC (134 mg, 0,7 mmol), und N-Gly-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (50 mg, 0,07 mmol) wurden 18 mg (29%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (acetone-d₆): 10,35 (bs, 1H), 9,21 (bs, 1H), 8,85 (bs, 1H), 8,78 (bs, 1H), 7,98 (d, 1H, J=6,5 Hz), 7,63 (m, 3 H), 7,28 (m, 5H), 7,19 (m, 4H), 6,62 (m, 2H), 5,08 (s, 2H), 4,71 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 1,37 (m, 6H).

Beispiel 44

N-(2,3,4,5- Tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110

[0202] Aus Rhodamin 110 (500 mg, 1,36 mmol) N,N-diisopropylethylamin (264 mg, 2,04 mmol) und 2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl Chlorid (433 mg, 2 mmol) wurden 121 mg (18%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 8,40 (d, J = 12,9 Hz, 1H), 8,01 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,71-7,59 (m, 3H), 7,16 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,01 (dd, 1H, J1 = 9 Hz, J2= 2,4 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 8,7Hz, 1H), 6,50 (m, 1H), 6,34 (dd, m, 1H), 3,93 (bs, 2H).

Beispiel 45

N-[Ac-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-(2,3,4,5 tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0203] Aus Ac-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (SEQ ID NO:5) (163 mg, 0,24 mmol), EDC (46 mg, 0,24 mmol) und N-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (40 mg, 0,079 mmol) wurden 25 mg (27%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 9,80-9,06 (m, 1H), 8,82-8,42 (m, 2H), 8,03-6,64 (m, 10H), 5,00-3,90 (m, 4H), 3,22-2,42 (m, 6H), 2,30-2,00 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,49-1,35 (m, 27H), 1,11-1,00 (m, 6H).

Beispiel 46

N-(Ac-Asp-Glu-Val-Asp)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0204] Aus N-(Ac-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut))-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl) (SEQ ID NO:5) Rhodamin 110 (22 mg, 0,018 mmol), Methylchlorid (1 ml) und Trifluoressigsäure (1 mL) wurde 18 mg (99%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,40-7,40 (m, 9H), 6,92-6,72 (d, J = 7,8Hz, 2H), 4,87 (m, 2H), 4,30-4,15 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,15-2,70 (m, 6H), 2,58 (m, 2H), 2,32 (m, 2H), 2,17-2,14 (d, 3H), 1,05-0,97 (m, 6H).

Beispiel 47

N-[Ac-Asp(OEt)-Glu(OEt)-Val-Asp(OEt)]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0205] Aus Ac-Asp(OEt)-Glu(OEt)-Val-Asp(OEt) (SEQ ID NO:5) (138 mg, 0,23 mmol), EDC (44 mg, 0,23 mmol) und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (40 mg, 0,076 mmol) wurden 38 mg (45%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 9,40-9,06 (m, 1H), 8,82-8,42 (m, 1H), 8,10-6,64 (m, 10H), 5,10-3,90 (m, 10H), 3,22-2,42 (m, 6H), 2,30-2,00 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,32-1,08 (m, 12H), 1,05-0,95 (m, 6H).

Beispiel 48

N-[Ddz-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0206] Aus Ddz-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut) (SEQ ID NO:5) (278 mg, 0,32 mmol), EDC (61,3 mg, 0,32 mmol) und N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (48 mg, 0,092 mmol) wurden 27 mg (21%) der Titelverbindung als Feststoff erhalten. ¹H NMR (CDCl₃): 9,10-8,40 (m, 3H), 8,10-7,10 (m, 12H), 6,02-5,90 (m, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,40-3,90 (m, 4H), 3,73 (m, 6H), 3,00-2,00 (m, 6H), 2,06 (s, 3H), 1,49-1,35 (m, 33H), 1,11-1,00 (m, 6H).

Beispiel 49

N-[H₂N-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0207] Zu einer gekillten Lösung (0°C) von N-[Ddz-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl (SEQ ID NO:5) Rhodamin 110 (18 mg, 0,013 mmol) in Methylchlorid (1 ml) wurde Trifluoressigsäure hinzugegeben (0,07 ml), die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mittels N-methylmorpholin (NMM) neutralisiert, konzentriert und gereinigt durch eine schnelle Säulen Chromatographie, um 14 mg (78%) der Titelverbindung zu ergeben. ¹H NMR (CD₃OD) 10,36 (bs, 1H), 9,45 (s, 1H), 9,33 (s, 1H), 8,20-7,38 (m, 8H), 6,926,72 (m, 2H), 5,00-3,92 (m, 6H), 3,00 (m, 2H), 2,60-1,90 (m, 6H), 1,60-1,10 (m, 30H), 1,05-0,97 (m, 6H).

Beispiel 50

N-[Octanoyl-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N' pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0208] Eine Mischung aus N-[H₂N-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'pentafluorbenzoyl (SEQ ID NO:5) Rhodamin 110 (7 mg, 0,0058 mmol), NSuccinimidyl Caprylat (2,78 mg, 0,0058) und 4-Methylmorpholin (0,59 mg) in Ethylacetat (1.1 ml) wurde bei Raumtemperatur für 3 Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rest wurde gereinigt mittels Säulenchromatographie und ergab 5 mg (64%) der Titelverbindung, ¹H NMR (CDCl₃) 9,83 (d, 1H), 9,10 (d, 1H), 8,79 (d, 1H), 8,41-7,00 (m, 8H), 6,80-6,40 (m, 2H), 5,05-3,72 (m, 4H), 3,30-1,95 (m, 8H), 1,60-0,90 (m, 47H).

Beispiel 51

N-(Octanoyl-Asp-Glu-Val-Asp)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0209] Aus N-[Octanoyl-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5) (3,0 mg, 0,0024 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylchlorid (0,4 ml) wurden 2,6 mg (96%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,15-7,20 (m, 8H), 6,83-6,75 (m, 2H), 4,70-3,90 (m, 4H), 3,15-1,90 (m, 8H), 1,68-0,95 (m, 19H).

Beispiel 52

N-[Pentafluorbenzoyl-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N' pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5)

[0210] Eine Mischung aus N-[H₂N-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'pentafluorbenzoyl (SEQ ID NO:5) Rhodamin 110 (7 mg, 0,0058 mmol), N-succinimidylpentafluorbenzoylate (5,2 mg, 0.017mmol) und 4-Methylmorpholin (1,18 mg, 0,0116 mmol) in Ethylacetat (2 ml) wurde bei Raumtemperatur 3 Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rest wurde gereinigt mittels Säulenchromatographie und ergab 3.1 mg (40%) der Titelverbindung zu ergeben. ¹H NMR (CDCl₃) 9,03-7,12(m, 11H), 6,86-6,70 (m, 2H), 5,05 (m, 1H), 4,93 (m, 1H), 4,54 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,15-2,00 (m, 6H); 1,47-1,24 (m, 28H), 0,89 (t, 6H).

Beispiel 53

N-(Pentafluorbenzoyl-Asp-Glu-Val-Asp)-N'-pentafluorbenzoyl Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 5)

[0211] Aus N-[pentafluorbenzoyl-Asp(OBut)-Glu(OBut)-Val-Asp(OBut)]-N'-pentafluorbenzoyl (SEQ ID NO:5) Rhodamin 110 (3,0 mg, 0,0022 mmol) und 50% Trifluoressigsäure in Methylchlorid (0,5 ml) wurden 0,9 mg (35%) der Titelverbindung erhalten. ¹H NMR (CD₃OD) 8,20-6,80 (m, 10H), 4,60-3,40 (m, 4H), 3,15-1,90 (m, 6H), 1,68-0,95 (m, 7H).

Beispiel 54

Fluorescence von N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (R110-PFB) verglichen mit Rhodamin 110

[0212] Eine Standardkurve bestehend aus 7 Konzentrationen von N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (0,5 bis 20 µM) in einem Volumen von 100µL wurde hergestellt. Die Fluoreszenz von jeder Konzentration wurde gemessen (3-fach) unter Verwendung eines BioTek fluoreszenz multiplate Lesegeräts, und das Signal wurde als Funktion der Farbstoffkonzentration geplottet. Die N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110-Kurve verglichen mit einer Standardkurve von R110 Fluoreszenz, die auf die gleiche Weise hergestellt worden war. Bei jeder getesteten Konzentration zeigte R110 eine 20 bis 50-fach höhere Fluoreszenz als N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 ([Fig. 1](#)). Die Daten zeigen, dass unter zellfreien Bedingungen N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 ein schwacher Fluoreszenzfarbstoff ist, verglichen mit Rhodamin 110.

Beispiel 55

Anfärben von Zellen mit N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 und Rhodamin 110

[0213] HL-60 Zellen (etwa 2×10^6) wurden in 50 µl Iscove's Medium platziert, ohne Serum oder Phenolrot, enthaltend 10 µM N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110. Eine parallele Probe wurde in das gleiche Medium platziert, enthaltend 10 µM Rhodamin 110. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 37°C in einem CO₂ Inkubator inkubiert, mittels Zentrifugation entfernt und in 50 µl frischem Medium ohne N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 oder Rhodamin 110 resuspendiert. Aliquote von jeder Zellsuspension wurden auf Mikroobjektträgern platziert und mit einem Nikon (inverted) Mikroskop mit Epifluoreszenz Illumination betrachtet. Die inkubierten Zelle mit Rhodamin 110 imitierte anfänglich ein starkes gelb-grünes Fluoreszenzsignal, aber dieses Signal ging mit der Zeit stark zurück, da der Farbstoff aus den Zellen in das umgebende Medium auslief. Im Gegensatz dazu imitierten Zellen, welche mit N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 inkubiert waren ein starkes gelb-grünes Fluoreszenzsignal, dessen Intensität konstant blieb während Betrachtungsperioden von wenigstens 15 Minute. Das N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 wurde gut von den Zellen zurückgehalten, wie dies aufgrund des Fehlens von Fluoreszenz im umgebenden Medium zu sehen ist ([Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#)). Dieses Experiment zeigt, dass N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 Zellen ebenso intensiv wie Rhodamin 110 anfärben kann, aber das unähnlich Rhodamin 110, das N-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 Signal über dies stark bleibt.

Beispiel 56

Suallung von N-Gly-R110-PFB durch HL-60 Lysate

[0214] N-Gly-R110 PFB wurde inkubiert mit einem Lysat, hergestellt aus HL-60 Zellen, und die Menge an Fluoreszenz wurde nach verschiedenen Zeiten nach Inkubation bei 37°C gemessen. Parallele Proben wurden unter Verwendung des Kontrollsubstrats N-Cbz-Gly-R110-PFB gefahren. Proben inkubiert mit N-Gly-R110-PFB zu-

sammen mit Zelllysate ergaben ein starkes Fluoreszenzsignal, welches linear über die Inkubationszeit getestet wurde. Die Daten für den 2 Stundenzeitpunkt sind in [Fig. 3](#) gezeigt. Proben inkubiert mit N-Gly-R110-PFB und Puffer gaben ein schwaches Fluoreszenzsignal. N-Cbz-Gly-R110-PFB gab kein Signal, wenn es mit Zelllysate oder Puffer inkubiert war, was anzeigt, dass diese Verbindung nicht durch Aminopeptidasen gespalten werden konnte, wie dies erwartet wurde. Die Daten zeigen, dass N-Gly-R110-PFB ein geeignetes fluorogenes Substrat für Aminopeptidasen ist. Es hat einen niedrigen Hintergrund bei dem nicht gespaltenen Zustand und ein starkes Fluoreszenzsignal im gespaltenen Zustand.

Beispiel 57

Anfärbung von gesamten lebenden HL-60 Zellen mit N-Gly-R110-PFB

[0215] HL-60 Zellen (etwa 2×10^6) wurden inkubiert mit $10 \mu\text{M}$ von N-Gly-R110-PFB für 2 Stunden bei 37°C in einem CO_2 Inkubator. Parallele Proben wurden in ähnlicher Weise inkubiert mit der aminoterminal blockierten Verbindung, N-Cbz-Gly-R110. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und in $50 \mu\text{l}$ frischem Medium ohne Substrat resuspendiert. Aliquote von jeder Zellsuspension wurden auf Mikroobjektträgern platziert und mit einem Nikon (inverted) Mikroskop mit Epifluoreszenz Illumination betrachtet. Zellen inkubiert mit N-Gly-R110-PFB zeigten eine starke, homogen verteilte, gelb-grüne Fluoreszenz. Zellen inkubiert mit N-Cbz-Gly-R110 fluoreszierten nicht oberhalb des Hintergrundlevels ([Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)). Diese Experimente zeigen, dass N-Gly-R110-PFB kann verwendet werden um Aminopeptidaseaktivität in Gesamtzellen zu detektieren und dass es ein intensives Signal ergibt, welches gut erhalten werden kann und welches nicht Gegenstand von schnellem Verblasen oder Schwächerwerden ist.

Beispiel 58

Spaltung von Z-DEVD-R110-PFB (SEQ ID NO:5) durch rekombinante Caspase-3 und durch HL-60 Lysate

[0216] Z-DEVD-R110-PFB (SEQ ID NO:5) wurde schnell gespalten durch rekombinante Caspase-3, resultierend in einen größeren als 10fachen Anstieg in der Fluoreszenz über das ungespaltene Substrat. Ein Lysat von apoptotischen HL-60 Zellen spaltete ebenfalls sehr schnell Z-DEVD-R110-PFB (SEQ ID NO:5) wie dies das Lysat aus Kontrollzellen tat, obwohl zu einem geringeren Ausmaß ([Fig. 5](#)). Diese Experimente zeigen, dass Z-DEVD-R110-PFB (SEQ ID NO:5) ein geeignetes fluorogenes Substrat für Caspase-3 ist mit einer niedrigen Hintergrund Fluoreszenz und einem stärkeren Fluoreszenzsignal in dem gespaltenen Zustand.

Beispiel 59

Spaltung von N-(Ac-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-R110 (SEQ ID NO:5) durch rekombinante Caspase-3

[0217] Die Spaltung von N-(Ac-DEVD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-R110 (SEQ ID NO:5) (Ac-DEVD-R110-TFB) (SEQ ID NO:5) durch Caspase-3 wurde in einem zellfreien Test ohne Verwendung von rekombinantem Enzym getestet. $10 \mu\text{M}$ Substrat wurden mit rekombinater Caspase-3 für 3 Stunden während 37°C inkubiert. Kontrollreaktionen umfaßten ein Beispiel mit keinem Enzym (Hintergrundwert) und ein Beispiel inkubiert in den Gegenwart des Caspase Inhibitors Ac-DEVD-CHO (SEQ ID NO:5) (kein spezifischer Wert). Wie aus [Fig. 6](#) gesehen werden kann, wurde Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) schnell gespalten durch rekombinante Caspase-3 was in einen groben 30fachen Anstieg der Fluoreszenz über dem Hintergrund und nicht spezifische Werte resultierte. Diese Experimente zeigen, dass Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) ein geeignetes fluorogenes Substrat für Caspase-3 ist, mit einer niedrigen Hintergrund Fluoreszenz und einem starken Fluoreszenzsignal im gespaltenen Zustand.

Beispiel 60

Induktion von Apoptose mit Staurosporin führt zur Spaltung von Z-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) in einem Gesamtzelltest

[0218] Jurkat T Leukämiezellen wurden in RPMI 1640 Medium (Life Technologies, Inc.) + 10% FCS (Sigma Chemical Company) in einem 5% CO_2 -95% Feuchtigkeitsinkubator bei 37°C wachsen gelassen und gehalten bei einer Zelldichte von zwischen 4 und 8×10^5 Zellen/ml. Die Zellen wurden geerntet bei $200\times$ und resuspendiert bei 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 Medium, enthaltend 10% FCS und 1 ml jeweils wurden dispensiert in 2 Vertiefungen einer 6-Vertiefungsplatte. Das Apoptose Induziermittel Staurosporin wurde mit einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ hinzugegeben und die Platte wurde inkubiert während 2 Stunden bei 37°C in einem 5%

CO₂-95% Feuchtigkeitsinkubator. Die Zellen wurden pelletisiert und inkubiert mit 50 µM Substrat Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) während 2 Stunden bei 37°C in Serum freien RPMI Medium. 500µl PBS wurden hinzugegeben und die Proben wurden analysiert mittels Flußcytometrie. Die gesamten Flußcytometrie-Analysen wurden durchgeführt mit einem FACScalibur (Becton Dickinson) unter Verwendung von Cell-Quest Analyse Software. [Fig. 7](#) zeigt, dass die Induktion von Apoptose in Jurkat Zellen durch Staurosporin zu einer Spaltung des Caspase-3 Substrats Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) unter Gesamtzelltest Bedingungen.

Beispiel 61

Induktion von Apoptose mit Anti-Fas Antikörper führt zur Spaltung von Ac-DEVD-R110-TFB in einem Gesamtzelltest

[0219] Jurkat T Leukämiezellen wurden wachsen gelassen und geerntet in ähnlicher Weise wie in Beispiel 60. Das Apoptose Induziermittel Anti-Fas Antikörper (CH-11; MBL) wurde mit einer Konzentration von 200ng/ml hinzugegeben und die Platte wurde für 2 Stunden bei 37°C in einem 5% CO₂-95% Feuchtigkeitsinkubator inkubiert. Die Zellen wurden pelletisiert und inkubiert mit 50 µM Substrat Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) während 2 Stunden bei 37°C in Serum freien RPMI Medium. 500µl PBS wurden hinzugegeben und die Proben wurden analysiert mittels Flußcytometrie. [Fig. 8](#) zeigte, dass die Induktion von Apoptose in Jurka Zellen durch Anti-Fas Antikörper führt zur Spaltung des Caspase-3 Substrat Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) unter Gesamtzelltest Bedingungen.

Beispiel 62

Spaltung von Z-DEVD-R110-TFB in Gesamtzellen kann gehemmt werden durch den Pan-Caspase Inhibitor

[0220] Jurkat 7 Leukämiezellen wurden wachsen gelassen und geerntet in ähnlicher Weise wie in Beispiel 60. Ein Pan-Caspase Inhibitor cbz-Val-Asp-fink (vgl. WO 099/18781) wurde zu einer der Vertiefungen hinzugegeben. Das Apoptose Induziermittel Staurosporin wurde hinzugegeben mit und ohne dem Caspase Inhibitor mit einer Konzentration von 0,05µg/ml und die Platte wurde inkubiert für 2 Stunden bei 37°C in einem 5% CO₂-95% Feuchtigkeitsinkubator. Die Zellen wurden pelletisiert und inkubiert mit 50 µM Substrat Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) während 2 Stunden bei 37°C in Serum freien RPMI Medium. 500µl PBS wurden hinzugegeben und die Proben wurden analysiert mittels Flußcytometrie. [Fig. 9](#) zeigte, dass die Induktion von Apoptose in Jurka Zellen durch Staurosporin zu einer Spaltung des Caspase Substrats Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) führt, was verhindert werden kann durch den pan-Caspase Inhibitor unter Gesamtzelltest Bedingungen.

Beispiel 63

Fluoreszenztest von CPP-32 in Jurkat Zellen wurde stimuliert mittels Fas Ligand

[0221] Die Spaltung des Enzyms Poly(ADP)Ribose Polymerase (PARP) scheint in allen Zellen stattzufinden, in denen die Caspase proteolytische Kaskade aktiviert ist. Aus diesem Grund wird die PARP Spaltung weitläufig verwendet als ein biochemischer Marker für Caspase vermittelte Apoptose. Die Fähigkeit einer cytoprotektiven Droge um PARP Spaltung zu blockieren wird aus einer Indikation der Fähigkeit der Droge betrachtet, um die Caspase proteolytische Kaskade und insbesondere CPP-32 (Caspase-3) die hauptsächliche PARP Protease zu hemmen. Die Messung von PARP Spaltung ist ein langsamer und zeitraubender Vorgang, der nicht für HTCA Tests geeignet ist und er ist sehr unbrauchbar für Drogenscreening und diagnostische Verfahren. Die Aktivität von CPP-32 innerhalb von Zellen kann getestet werden mit Hilfe der Fluoreszenztests wie sie hierin beschrieben werden, unter Verwendung z. B. des fluorogenen CPP-31 Substrats Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) und Inkubation z. B. von Jurkat Zellen, eine human T-Zelllinie mit dem Substrat Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) während Fas-vermittelter Apoptose. Das Zellkulturmodell der Apoptose ist sehr gut charakterisiert und ist dafür bekannt, dass es die Aktivierung von wenigstens zwei Caspasen, Caspase-3 (CPP32) und Caspase-8 (FLICE/MACH).

[0222] Für CPP-32 Fluoreszenztests, können Jurkat Zellen ausgesäht werden mit einer Dichte von z. B. 10.000 Zellen pro Vertiefung in 96-Vertiefungsmultischalen in RPMI 1640 Medium, enthaltend 10% FBS, oder einem anderen geeigneten Medium. Schalen, die eine große Zahl von Vertiefungen (z. B. 300-3.000 Vertiefungen pro Schale) enthalten, können ebenfalls verwendet werden (mit annähernd angepasstem Volumen und Zahl der Zellen). Die Zellen können vorinkubiert werden mit z. B. 0,01nM-1M von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) in der Gegenwart oder Abwesenheit einer Testverbindung oder Verbindungen mit einer Konzentration

von z. B. 0,01nM-1M für 2 Stunden bei 37°C in einem CO₂ Inkubator. Die Basislinienfluoreszenzemission kann aufgezeichnet werden mit einem geeigneten Fluoreszenzaufzeichnungsgerät vorher oder zu der Zeit nach der Zugabe von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) und Testverbindung oder Verbindungen. Ein monoklonaler Antikörper gegen Fas kann dann hinzugegeben werden mit einer Endkonzentration von 500ng/ml. Inkubation bei 37°C in einem CO₂ Inkubator kann fortgeführt werden für weitere 4 Stunden. Am Ende der Inkubationsperiode kann die Fluoreszenz aufgezeichnet werden in den Vertiefungen mit einem geeigneten Plattenlesegerät oder einem anderen geeigneten Instrument, das die Fluoreszenz detektieren kann. Der Anstieg bei der Enzymaktivität, die durch die Stimulation der Caspase Kaskade mit dem Fas Liganten verursacht wurde, kann kalkuliert werden, durch Abziehen der Fluoreszenz, gemessen an der Basislinie von der Fluoreszenz gemessen nach der Stimulation von Apoptose Enzymen mit Fas Ligant Antikörper. Die Spezifität der Fluoreszenzemission als ein Indikator der Caspase Kaskade Aktivierung kann bestimmt werden durch Hinzugeben eines bekannten Caspase Inhibitors wie Z-DEVD-fmk (SEQ ID NO:5), Z-VAD-fmk (Hara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2007-12(1997)) oder jeglichen anderen Caspase Kaskade Inhibitor in das Inkubationsgemisch. Die vorgegebene Vorinkubationszeit und die gesamte Inkubationszeit kann variiert werden wie es geeignet erscheint, d. h. sie kann kürzer oder länger sein, wie dies im Beispiel angegeben ist. Die optimale Inkubationszeit kann experimentell in jeder Zelle, Zelllinie oder Gewebe bestimmt werden, indem die Caspaseaktivität gemessen werden soll. Anstelle von Ac-DEVD-R110-TFB (SEQ ID NO:5) als fluorogenes Substrat kann jedes andere fluorogene oder fluoreszierende Substrat der Erfindung verwendet werden. Anstelle von Jurka Zellen können andere Zellen oder Zelllinien, die normal sind, krank, infiziert oder krebsartig verwendet werden. Diese Zellen oder Zelllinien können erhalten werden von jeglichem Gewebe oder internem oder externem Organ oder von jeglichem Tumor oder Tumoren oder Krebsarten. Die Zellen oder Zelllinien können in Form von Suspensionen, Clustern, isolierten Zellen, Gewebefragmenten, Biopsien, oder Zellen die in Kultur gewachsen sind von Monolayern oder in Suspension vorliegen.

Beispiel 64

Verwendung von Fluoreszenztests beim Screening von Drogen, die die Caspase Kaskade stimulieren

[0223] Drogen, die die Caspase Kaskade in Abwesenheit von Fas Ligant stimulieren, können nützlich sein, z. B. als Anti-Krebs chemotherapeutisches Mittel. Der Test, der in Beispiel 63 beschrieben ist, kann verwendet werden, um Drogen zu screenen, die die Caspase Kaskade stimulieren, indem der Test unter ähnlichen Bedingungen wie in Beispiel 63 beschrieben ist ausgeführt wird, mit der Ausnahme, dass eine bekannte oder nicht bekannte Verbindung mit bekannten oder nicht bekannten Anti-Krebs oder Anti-Tumor Aktivitäten das Fas-Liganten Reagenz ersetzt.

Beispiel 65

Verwendung von Fluoreszenztests beim Screening von Drogen, welche die Caspase Kaskade, stimuliert mit Fas Ligant oder einem anderen Apoptose Induktor, inhibieren oder potenzieren

[0224] Drogen, die die Caspase Kaskade inhibieren, können nützlich sein beim Behandeln von Degenerativen oder anderen Krankheiten, die verursacht wurden oder in Assoziation sind mit einer inadäquaten Aktivierung der Caspase Kaskade. Drogen, die die Wirkung von einem anderen Caspase Stimulator potenzieren, z. B. Fas Ligant oder eine Anti-Krebs Droge oder Mittel, sind geeignet, um Krebs oder Tumore zu behandeln, hervorgerufen durch oder in Assoziation mit einer ungeeigneten Funktion der Caspase Kaskade. Die Tests und Reagenzien, die hierin beschrieben sind können verwendet werden, um die Drogen zu screenen, die entweder die Caspase Kaskade hemmen oder potenzieren in Zellen durch Durchführen des Tests wie in Beispiel 62 beschrieben ist, unter Verwendung von Fas-Ligant oder jeglichem anderen Mittel, dass die Caspase Kaskade stimuliert oder einen anderen Apoptoseweg in der Gegenwart eine Testsubstanz die mit der Wirkung der ersten Apoptose oder Caspase Kaskade Induktor hemmt oder potenziert oder synergistisch wird.

Beispiel 66

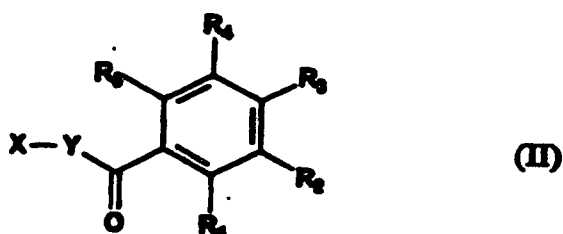
Verwendung des Fluoreszenztest beim Testen von Krebszellproben von Patienten zur Chemosensitivität gegenüber Anti-Krebs Drogen

[0225] Es ist bekannt, dass der gleiche Krebs in verschiedenen Patienten eine große Variabilität gegenüber der Behandlung mit Anti-Krebs Drogen zeigt. Daher ist es sehr schwierig vorauszusagen, ob ein Krebs in einem Patienten behandelbar ist mit einer besonderen Anti-Krebs Droge bevor die Behandlung begonnen wird. Die hierin beschriebenen Fluoreszenztests erlauben ein Chemosensitivitäts- oder Drogenwiderstandstesten

von Krebs oder Tumorzellen oder Gewebeproben, welche von einzelnen oder Tumorpatienten entnommen worden sind. Um die Chemosensitivitätstests durchzuführen, kann ein Fluoreszenztest unter Verwendung einer Krebszelle oder Krebsgewebe, welches von einem Patienten entnommen worden ist, durchgeführt werden, wie dies im Beispiel 65 beschrieben ist. Unter Verwendung dieses Ansatzes können verschiedene Drogen mit bekannten oder unbekannten chemotherapeutischen Aktivitäten getestet werden auf ihre Kapazität, um die Caspase Kaskade zu stimulieren. Die Ergebnisse aus diesem Test liefern Informationen die verwendet werden können, um eine optimale chemotherapeutische Drogenbehandlung für den Patienten zu entwickeln.

Patentansprüche

1. Verbindung mit der folgenden Strukturformel



oder ein biologisch akzeptables Salz oder Pro-reportermolekül davon, wobei:

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Aminosäurerest und einem Peptid;

Y eine Fluoreszenzhälfte; und

R₁-R₅ jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Iod, Haloalkyl, Aryl, Cycloalkyl, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Aralkyl, Aralkenyl, Arylalkinyl, Hydroxyalkyl, Nitro, Amino, Cyano, Acylamino, Acyl, Hydroxy, Acyloxy, Alkoxy, Alkylthio, und Carboxy;

vorausgesetzt, dass wenigstens einer von R₁, R₃ und R₅ ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Fluor und Chlor.

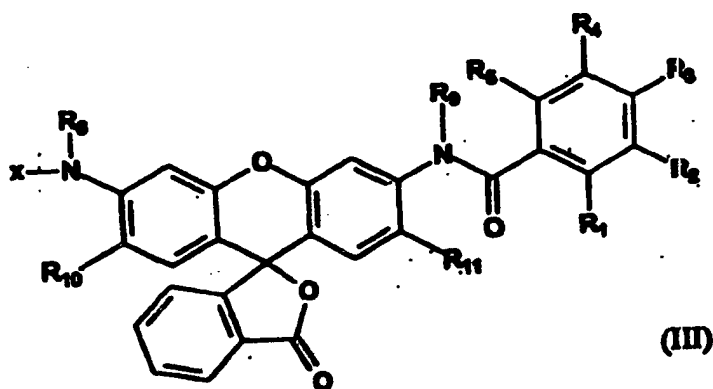
2. Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei X ein Substrat für ein Caspaseenzym ist.

3. Verbindung gemäß Anspruch 2, wobei das Substrat ein N-blockiertes Peptid ist, das aus C-terminaler Asp und wenigstens einer Aminosäure einer Peptidkette besteht, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEV D (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO:19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26), IETD (SEQ ID NO:24), IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27).

4. Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei alle von R₁-R₅ Fluor sind, oder vier von den R₁-R₅ Fluor sind.

5. Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei Y Rhodamin 110 ist.

6. Verbindung mit der folgenden Strukturformel:



oder ein biologisch akzeptables Salz oder Pro-reportermolekül davon, wobei

X ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Aminosäurerest und einem Peptid;

R_8 und R_9 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Alkyl und Aryl;
 R_{10} und R_{11} jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und Alkyl;
 R_1 - R_5 jeweils unabhängig Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Iod, Haloalkyl, Aryl, Cycloalkyl, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Aralkyl, Aralkenyl, Arylalkinyl, Hydroxyalkyl, Nitro, Amino, Cyano, Acylamino, Acyl, Hydroxy, Acyloxy, Alkoxy, Alkylthio, und Carboxy sind;
 vorausgesetzt, dass wenigstens einer von R_1 , R_3 und R_5 ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Fluor und Chlor.

7. Verbindung gemäß Anspruch 6, wobei alle von R_1 - R_5 Fluor sind.

8. Verbindungen gemäß Anspruch. wobei alle von R_8 - R_{11} Wasserstoff sind.

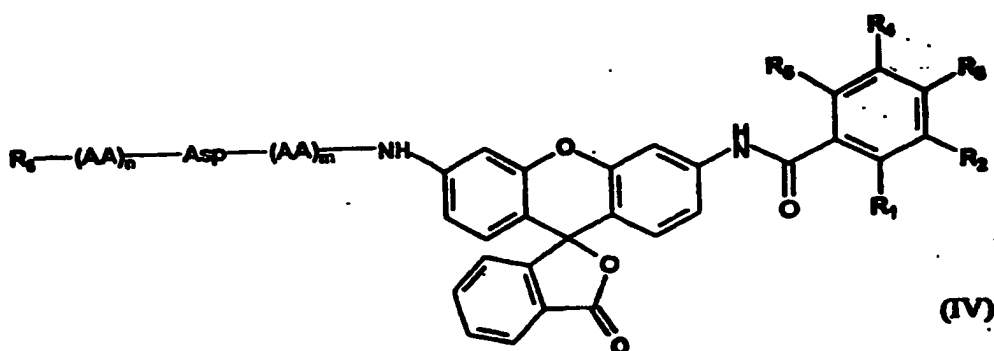
9. Verbindung gemäß Anspruch 6, wobei X ein Substrat für ein Caspaseenzyme ist.

10. Verbindung gemäß Anspruch 9, wobei das Substrat ein N-blockiertes Peptid ist, das aus C-terminaler Asp und wenigstens einer Aminosäure einer Peptidkette besteht, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEVD (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO:19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26), IETD (SEQ ID NO:24), IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27).

11. Verbindung gemäß Anspruch 9, wobei X ein Substrat für Granzym B ist.

12. Verbindung gemäß Anspruch 6, wobei X ein N-blockiertes Tetrapeptid ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27).

13. Verbindung mit der folgenden Strukturformel:



oder ein biologisch akzeptables Salz oder Pro-reportermolekül davon, wobei

R_6 eine N-terminale Schutzgruppe ist;

alle AA unabhängig eine Aminosäure sind;

n eine ganze Zahl von 0-5 ist;

m eine ganze Zahl von 0-3 ist; und

R_1 - R_5 jeweils unabhängig Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Iod, Haloalkyl, Aryl, Cycloalkyl, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Aralkyl, Aralkenyl, Arylalkinyl, Hydroxyalkyl, Nitro, Amino, Cyano, Acylamino, Acyl, Hydroxy, Acyloxy, Alkoxy, Alkylthio und Carboxy sind;

vorausgesetzt, dass wenigstens einer von R_1 , R_3 und R_5 ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Fluor und Chlor.

14. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei R_6 eine N-terminale Schutzgruppe ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus t-Butyloxycarbonyl, Acetyl, Octanoyl, Dodecanoyl, Benzyloxycarbonyl und Pentafluorbenzoyl.

15. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei $n=3$ und die $(AA)_n$ Asp ein Element ist, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus WEHR (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEVD (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DSLD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID

NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO:19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26) und IETD (SEQ ID NO:24).

16. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei R_6 -(AA)_n-Asp ein N-blockiertes Peptid ist, das aus C-terminaler Asp und wenigstens einer Aminosäure einer Peptidkette besteht, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus WEHD (SEQ ID NO:1), YVAD (SEQ ID NO:2), LEHD (SEQ ID NO:3), DETD (SEQ ID NO:4), DEV D (SEQ ID NO:5), DEHD (SEQ ID NO:6), VEHD (SEQ ID NO:7), LETD (SEQ ID NO:8), SHVD (SEQ ID NO:10), DELD (SEQ ID NO:11), DGPD (SEQ ID NO:12), DEPD (SEQ ID NO:13), DGTD (SEQ ID NO:14), DLND (SEQ ID NO:15), DEED (SEQ ID NO:16), DSLD (SEQ ID NO:17), DVPD (SEQ ID NO:18), DEAD (SEQ ID NO:19), DSYD (SEQ ID NO:20), ELPD (SEQ ID NO:21), VEID (SEQ ID NO:26), IETD (SEQ ID NO:24), IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27).

17. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei n=3 und die (AA)_n-Asp ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus IEPD (SEQ ID NO:23) und VEPD (SEQ ID NO:27).

18. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei m=2 und AA ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus G und A.

19. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei wenigstens einer von R₁-R₅ Fluor ist.

20. Verbindung gemäß Anspruch 13, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Z-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEV D)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Ac-LETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:8),
 N-(Ac-DEV D)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Ac-IETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:24),
 N-(Ac-LQTD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:72),
 N-(Ac-EETD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:73),
 N-(Ac-LEV D)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:9),
 N-(Ac-AEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:74),
 N-(Ac-WEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:1),
 N-(Ac-YVAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Ac-LEHD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:3),
 N-(Ac-D(OEt)E(OEt)VD(OEt))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VAD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-VD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(PFB-DEV D)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Octanoyl-DEV D)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-DEV DG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(PFB-DEV DG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEV D)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Ac-DEV D)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Ac-IETD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:24),
 N-(Ac-LQTD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:72),
 N-(Ac-EETD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:73),
 N-(Ac-LEV D)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:9),
 N-(Ac-AEHD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:74),
 N-(Ac-WEHD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:1),
 N-(Ac-YVAD)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEV DG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-YVAD)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-DEV D)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VAD)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(Z-DEV DG)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-DEV D)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-DEV DG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:76),
 N-(Z-YVAD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:2),
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),

N-(Z-E(OAM)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-D(OMe)E(OMe)VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VD(OAM))-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5),
 N-(Z-VD(OAM))-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(Z-D(OAM)E(OAM)VD(OAM))-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:5), und
 N-(Z-VD(OAM))-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110.

21. Verfahren zur Herstellung der Verbindung gemäß Anspruch 13, umfassend:

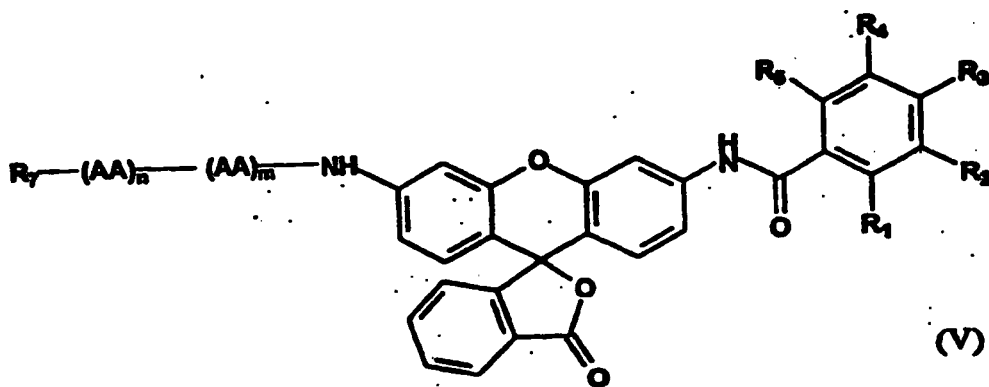
- Reagieren von Rhodamin mit einem substituierten Benzoylchlorid, um N-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- Kondensieren des N-substituierten Benzoyl-Rhodamins zusammen mit N-Z-Gly, um N-Z-Gly-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- Entfernen der Z-Gruppe, um N-Gly-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- Kondensieren des N-Gly-N'-substituierten Benzoyl-Rhodamins mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t), um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t)-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und
- Entfernen der OBu-t-Schutzgruppe, um N-(Z-(AA)_n-Asp-Gly)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben.

22. Verfahren zur Herstellung der Verbindung gemäß Anspruch 13, umfassend:

- Reagieren von Rhodamin mit einem substituierten Benzoylchlorid, um N-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben;
- Kondensieren des N-substituierten Benzoyl-Rhodamins mit Z-(AA)_n-Asp(OBu-t), um N-(Z-(AA)_n-Asp(OBu-t))-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben; und
- Entfernen der OBu-t-Schutzgruppe, um N-(Z-(AA)_n-Asp)-N'-substituiertes Benzoyl-Rhodamin zu ergeben.

23. Verfahren gemäß Anspruch 21 oder 22, wobei n=3 und -(AA)_n ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus WEH, YVA, LEH, DET, DEV, DEH, VEH, LET, SHV, DEL, DGP, DEP, DGT, DLN, DEE, DSL, DVP, DEA, DSY, ELP, VED, IEP und IET.

24. Verbindung mit der folgenden Strukturformel:



oder ein biologisch akzeptables Salz oder Pro-reportermolekül davon, wobei R₇ ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff und einer N-terminalen Schutzgruppe, jede AA unabhängig eine Aminosäure ist;

n eine ganze Zahl von 0-5 ist;

m eine ganze Zahl von 0-3 ist;

R₁-R₅ unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Iod, Haloalkyl, Aryl, Cycloalkyl, Alkyl, Alkenyl, Alkynyl, Aralkyl, Aralkenyl, Arylalkinyl, Hydroxyalkyl, Nitro, Amino, Cyano, Acylamino, Acyl, Hydroxy, Acyloxy, Alkoxy, Alkylthio, und Carboxy;

vorausgesetzt, dass wenigstens einer von R₁, R₃ und R₅ ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Fluor und Chlor.

25. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei wenigstens einer von R₁-R₅ Fluor ist.

26. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei R₇ H ist; n=1; (AA)_n M ist; m eine ganze Zahl von 1-2 ist; und (AA)_m ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus GG, GA, AG, G, und A.

27. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(MG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-M-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MAG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MGA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-M-N'-(2,3,4,5-tetrafluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MA)-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-M-N'-(3,4,5-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110,
 N-(MG)-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110, und
 N-M-N'-(2,4,6-trifluorbenzoyl)-Rhodamin 110.

28. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei R_7 eine N-terminale Schutzgruppe ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus t-Butyloxycarbonyl, Acetyl, Octanoyl, Dodecanoyl, Benzyloxycarbonyl und Pentafluorbenzoyl.

29. Verbindung gemäß Anspruch 28, wobei $(AA)_n$ -(AA)_m ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus SQNY-PIV (SEQ ID NO:28), ARVL-AEA (SEQ ID NO:29), ATIM-MQR (SEQ ID NO:30), RQAN-FLG (SEQ ID NO:31), PGNF-LQS (SEQ ID NO:32), SFSF-PQI (SEQ ID NO:33), TLNF-PIS (SEQ ID NO:34), AETF-YVD (SEQ ID NO:35) oder RKVL-FLD (SEQ ID NO:36); SQNY-PI (SEQ ID NO:117), ARVL-AE (SEQ ID NO:118), ATIM-MQ (SEQ ID NO:119), RQAN-FL (SEQ ID NO:120), PGNF-LQ (SEQ ID NO:121), SFSF-PQ (SEQ ID NO:122), TLNF-PI (SEQ ID NO:123), AETF-YV (SEQ ID NO:124) oder RKVL-FL (SEQ ID NO:125), SQNY-P (SEQ ID NO:126), ARVL-A (SEQ ID NO:127), ATIM-M (SEQ ID NO:128), RQAN-F (SEQ ID NO:129), PGNF-L (SEQ ID NO:130), SFSF-P (SEQ ID NO:131), TLNF-P (SEQ ID NO:132), AETF-Y (SEQ ID NO:133) und RKVL-F (SEQ ID NO:134).

30. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Ac-SLNFPN)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:80),
 N-(Ac-SLNFPPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:81),
 N-(Ac-SLNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:82),
 N-(Ac-LNFPPIV)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:83),
 N-(Ac-LNFPPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:84),
 N-(Ac-LNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:85),
 N-(Ac-RGFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:37),
 N-(Z-LNFPN)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:83),
 N-(Z-LNFPPI)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:84),
 N-(Z-LNFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:85),
 N-(Z-RGFP)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:37),
 N-(Z-RQANFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:31),
 N-(Z-RQANFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:86),
 N-(Z-RQANF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:87),
 N-(Z-RKVLFLD)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:36),
 N-(Z-RKVLFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:88),
 N-(Z-RKVLFLF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:89),
 N-(Z-ARVLFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:90),
 N-(Z-ARVLFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:91),
 N-(Z-ARVLF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:92),
 N-(Z-SQNYFLG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:93),
 N-(Z-SQNYFL)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:94), und
 N-(Z-SQNYF)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:95).

31. Verbindung gemäß Anspruch 28, wobei $(AA)_n$ -(AA)_m ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus LRGGG (SEQ ID NO:101), LRGGA (SEQ ID NO:102), MRGGG (SEQ ID NO:96), MRGGA (SEQ ID NO:135), IRGGG (SEQ ID NO:97), IRGGA (SEQ ID NO:136), LVGGG (SEQ ID NO:98), LVGGA (SEQ ID NO:137), MVGGG (SEQ ID NO:99), MVGGA (SEQ ID NO:138), IVGGG (SEQ ID NO:100), IVGGA (SEQ ID NO:139), LRGG (SEQ ID NO:55), MRGG (SEQ ID NO:56), IRGG (SEQ ID NO:57), LVGG (SEQ ID NO:58), MVGG (SEQ

ID NO:59) und IVGG (SEQ ID NO:60).

32. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Ac-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:101),
 N-(Ac-MRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:96),
 N-(Ac-IRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:97),
 N-(Ac-LVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:98),
 N-(Ac-MVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:99),
 N-(Ac-IVGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:100),
 N-(Ac-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:102),
 N-(Ac-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:35),
 N-(Z-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:101),
 N-(Z-LRGGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:102), und
 N-(Z-LRGG)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:55).

33. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Ac-LVLASSS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:103),
 N-(Ac-LVLASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:104),
 N-(Ac-LVLAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:105),
 N-(Ac-LVLA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 62),
 N-(Z-LVLASSS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:103),
 N-(Z-LVLASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:104),
 N-(Z-LVLAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:105), und
 N-(Z-LVLA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:62).

34. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Ac-VVNASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:106),
 N-(Ac-VVNAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:107),
 N-(Ac-VVNA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:64),
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:108),
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:109),
 N-(Ac-Tbg-Tbg-NA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:110),
 N-(Z-Tbg-Tbg-NASS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:108),
 N-(Z-Tbg-Tbg-NAS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:109), und
 N-(Z-Tbg-Tbg-NA)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:110).

35. Verbindung gemäß Anspruch 24, wobei die Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

N-(Ac-DDIVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:111),
 N-(Ac-DIVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:112),
 N-(Ac-IVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:113),
 N-(Ac-IVPCSMS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:114),
 N-(Ac-IVPCSM)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:115),
 N-(Ac-IVPCS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:116),
 N-(Ac-IVPC)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO: 69),
 N-(Z-IVPCSMST)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:113),
 N-(Z-IVPCSMS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:114),
 N-(Z-IVPCSM)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:115), und
 N-(Z-IVPCS)-N'-pentafluorbenzoyl-Rhodamin 110 (SEQ ID NO:116).

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

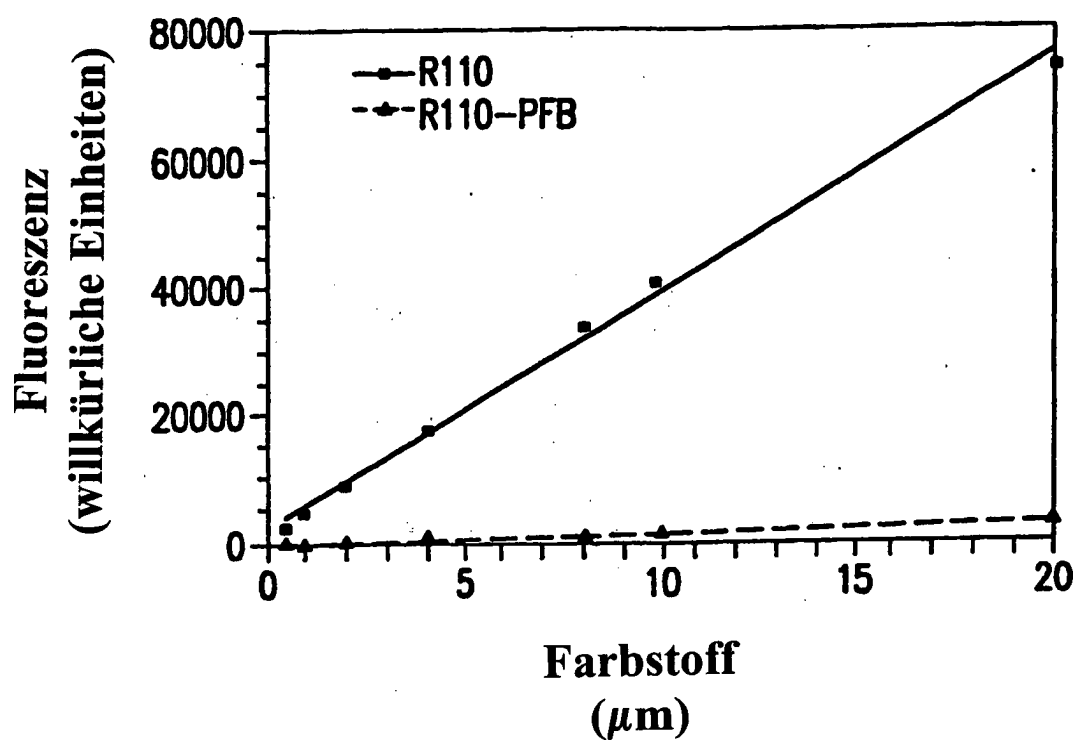


FIG. 1

R110

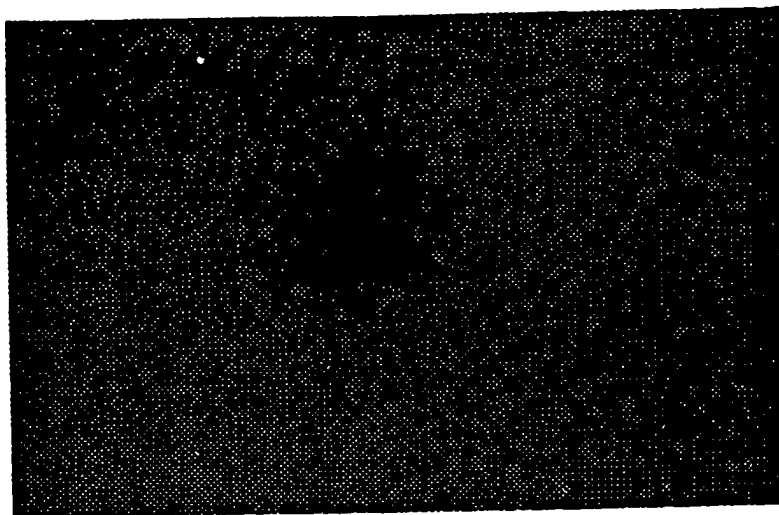


FIG.2A

Pentafluorbenzoyl R110

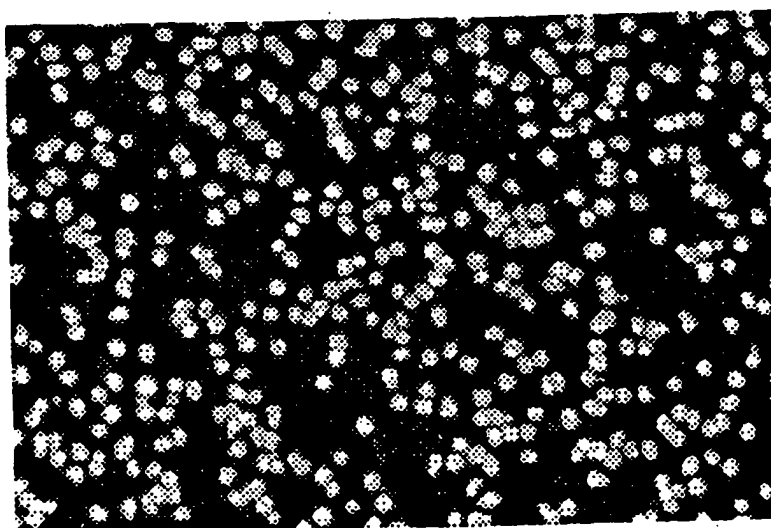


FIG.2B

**Spaltungsaktivität
(willkürliche Einheiten)**

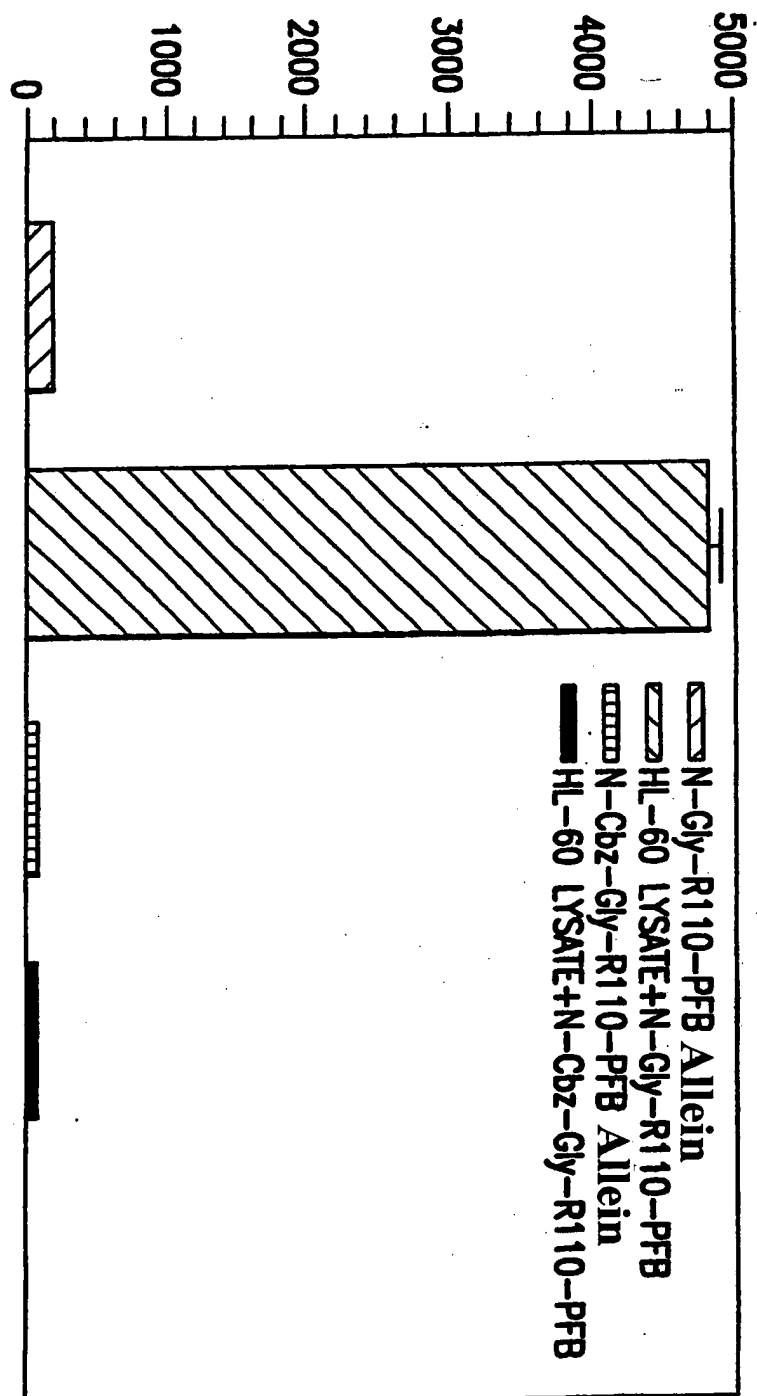


FIG. 3

N-Gly-R110-PFB

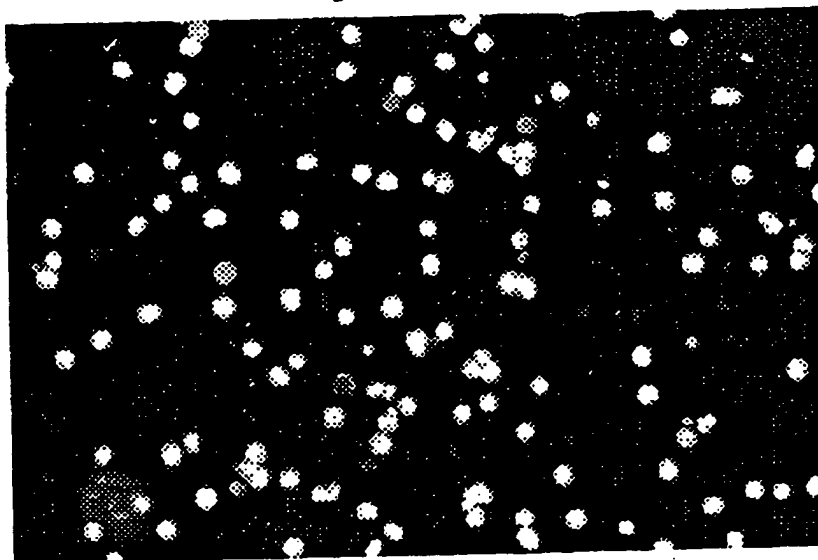


FIG.4A

N-Cbz-Gly-R110-PFB

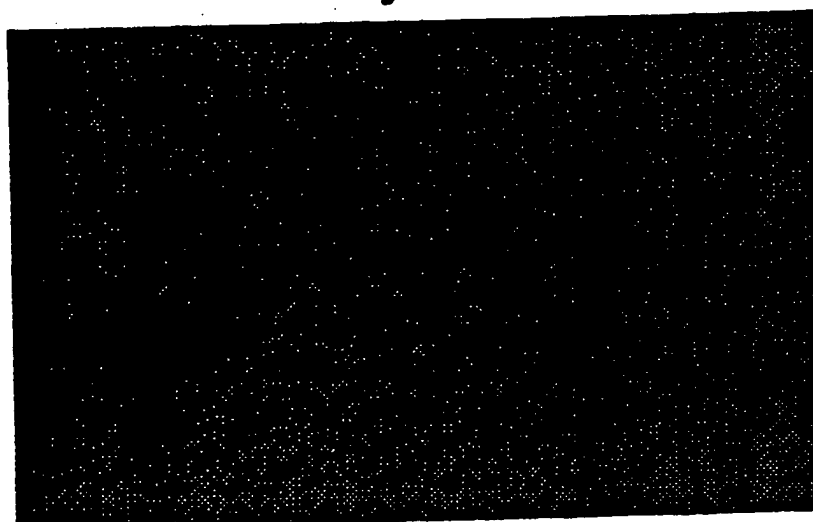


FIG.4B

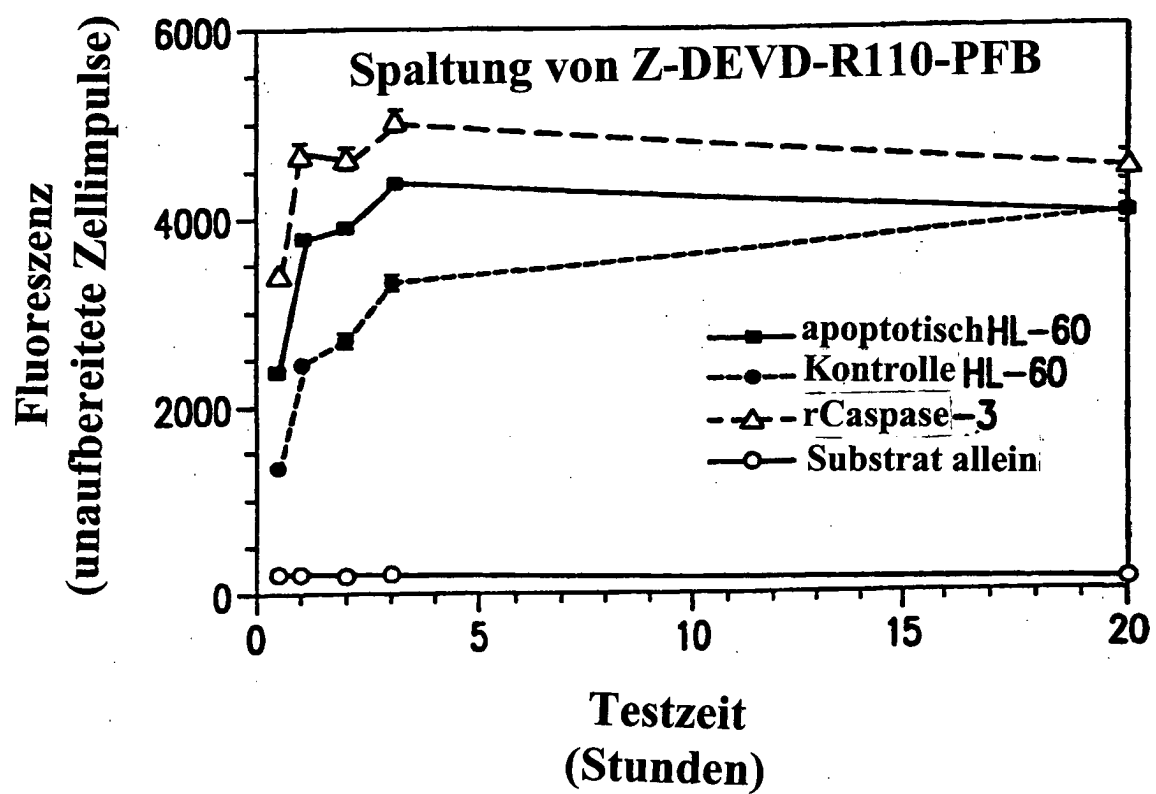


FIG. 5

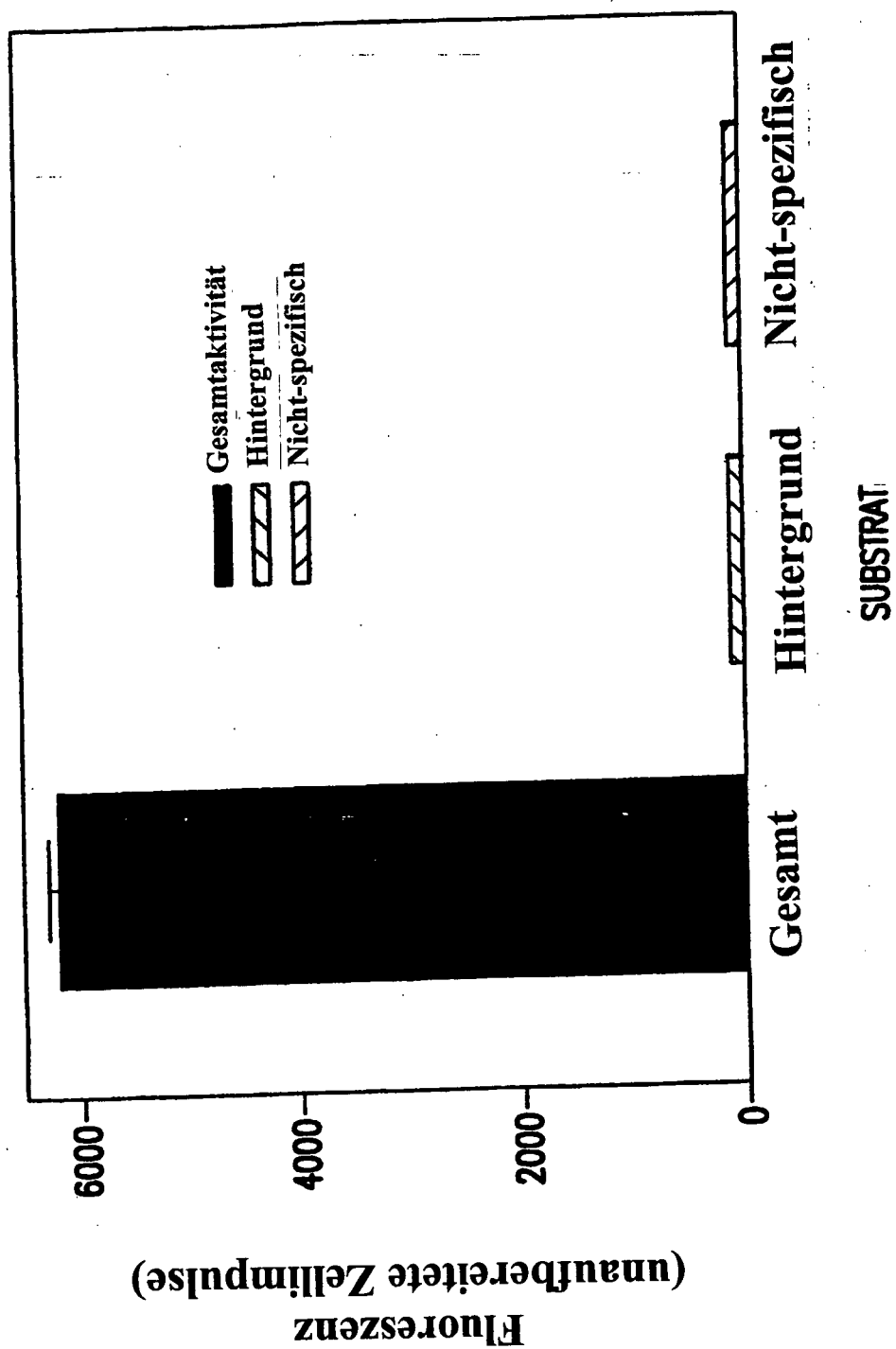


FIG. 6

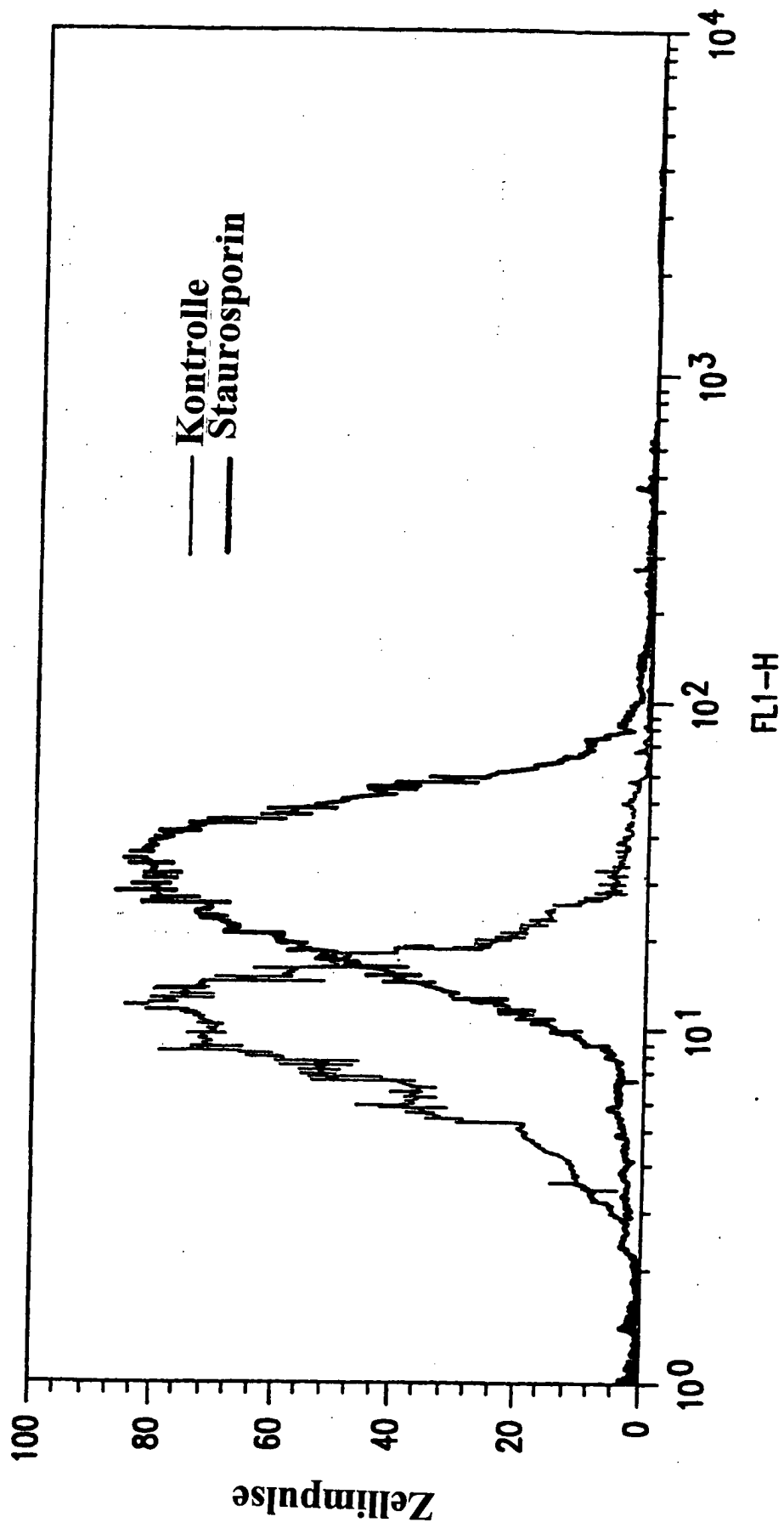


FIG. 7

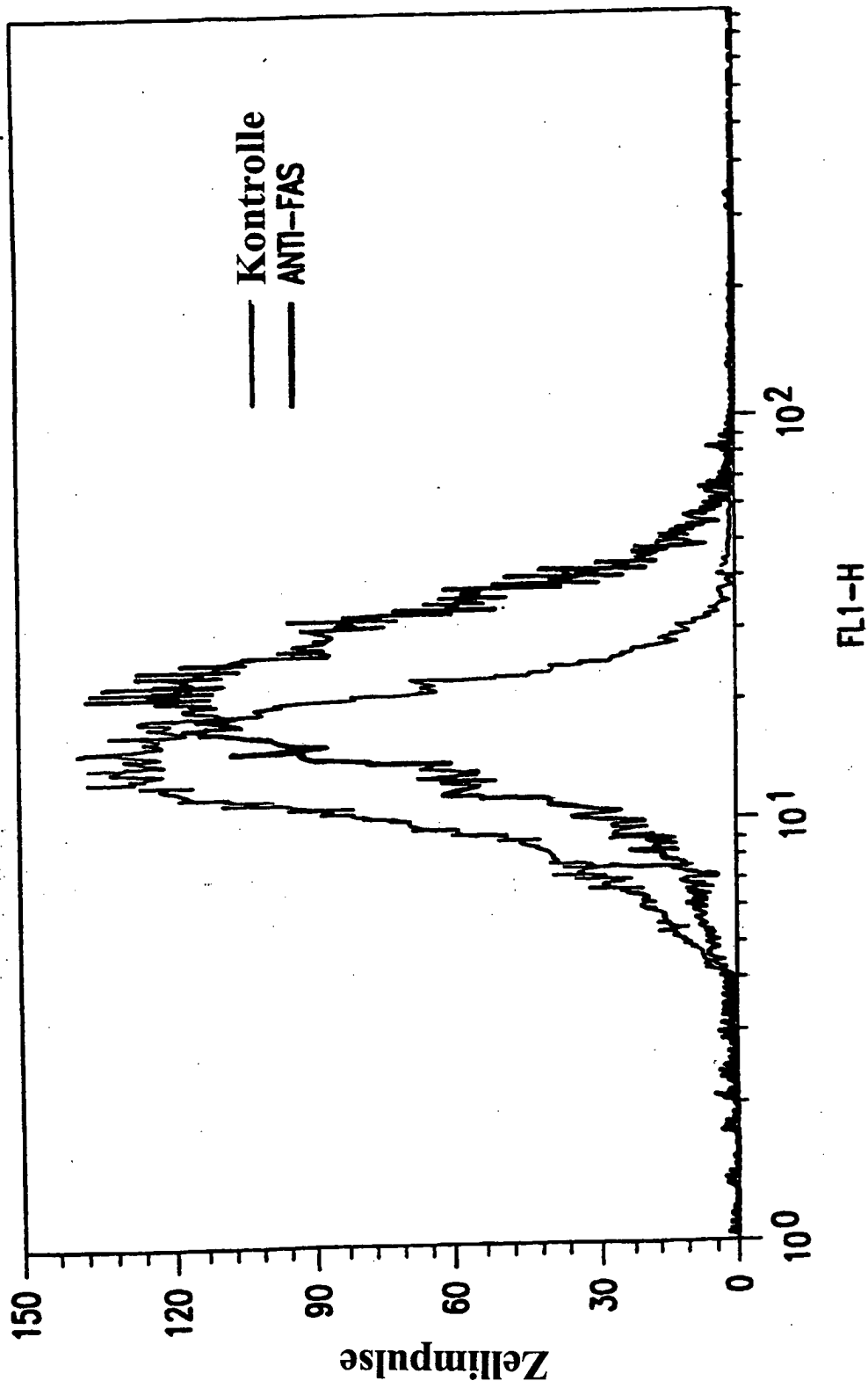


FIG. 8

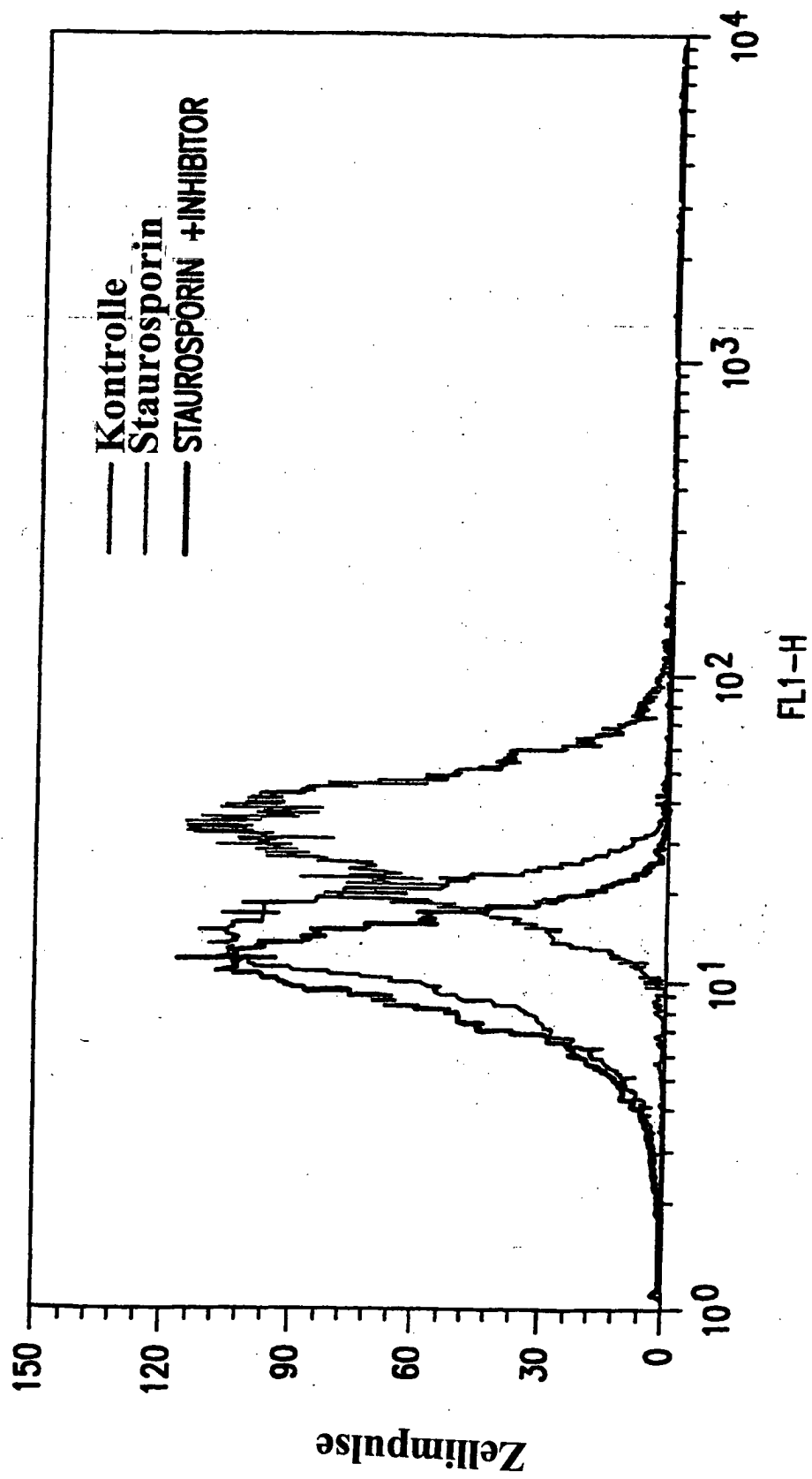


FIG. 9