



(10) **DE 10 2020 114 139 A1** 2021.12.02

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2020 114 139.4**

(22) Anmeldetag: **27.05.2020**

(43) Offenlegungstag: **02.12.2021**

(51) Int Cl.: **C09B 49/12 (2006.01)**

**C07D 497/04 (2006.01)**

**C07D 339/00 (2006.01)**

(71) Anmelder:

**Universität Potsdam, 14469 Potsdam, DE**

(74) Vertreter:

**Gulde & Partner Patent- und  
Rechtsanwaltskanzlei mbB, 10179 Berlin, DE**

(72) Erfinder:

**Wessig, Pablo, Prof. Dr., 13353 Berlin, DE; John,  
Leonard, 14482 Potsdam, DE**

(56) Ermittelte Stand der Technik:

**WO 91/ 12 024 A1**

**DALLACKER, F.; KAISER, E.; UDDRICH,  
P.: Derivate des Methylendioxybenzols, XV.**

**Schwefel und Selen enthaltende Heterocyclen  
des Brenzcatechin-methylenäthers. In: Justus  
Liebigs Ann. Chem., Bd. 689, 1965, Nr. 1, S. 179-  
188. - ISSN 0075-4617**

**WAWRZINEK, R. [u.a.]: DBD Dyes as  
Fluorescence Lifetime Probes to Study  
Conformational Changes in Proteins. In: Chem.  
Eur. J., Bd. 19, 2013, Nr. 19, S. 17349-17357. -  
ISSN 0947-6539**

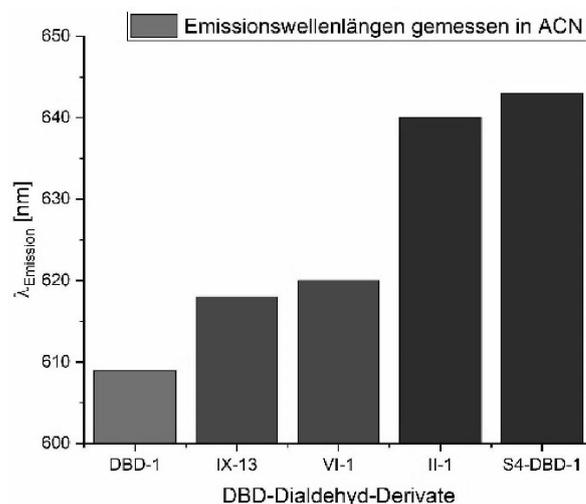
**ZHAO, X. [u.a.]: Iodine-catalyzed thiolation of  
electron-rich aromatics using sulfonyl hydrazides  
as sulfenylation reagents. In: Org. Biomol. Chem.,  
Bd. 14, 2016, Nr. 3, S. 1131-1137. - ISSN 1477-0520**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

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

(54) Bezeichnung: **Thiopolyphenol-basierte Fluoreszenzfarbstoffe**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige Fluoreszenzfarbstoffe basierend auf Sauerstoff- und Schwefel-haltigen Heterozyklen. Die Erfindung betrifft ferner ein Konjugat aus dem genannten Fluoreszenzfarbstoff und Biomolekülen sowie eine Methode zur Synthese der erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe.



## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft neuartige Fluoreszenzfarbstoffe basierend auf Thiopolyphenol-Derivaten die einen oder zwei Thio-Substituenten aufweisen. Die Erfindung betrifft ferner ein Konjugat aus dem genannten Fluoreszenzfarbstoff und Biomolekülen sowie eine Methode zur Synthese der erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe.

### Technologischer Hintergrund

**[0002]** Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Systeme, d.h. Materialien die solch fluoreszierende Eigenschaften aufweisen werden als Fluorophore bezeichnet. Werden diese für Färbungen verwendet, so bezeichnet man diese als Fluorochrome oder Fluoreszenzfarbstoffe. Fluoreszenzfarbstoffe finden vielseitige Anwendungen in der Biochemie, Biologie und Medizin, z.B. in Diagnostik-Kits, als Marker bei der Strukturaufklärung von Proteinen oder bei Wirkstoffscreenings.

**[0003]** Fluoreszenzfarbstoffe werden durch eine Reihe von Parametern charakterisiert, die dem Anwender die Auswahl eines geeigneten Farbstoffs abhängig von dem gewünschten Verwendungszweck erlauben. Hier sind vor allem zu nennen die Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$  (oder  $\lambda_{abs}$ ), welche dem Maximum der Absorptionsbande entspricht, die Emissionswellenlänge  $\lambda_{em}$ , welche dem Maximum der Emissionsbande entspricht, die Stokes-Verschiebung (Stokes-Shift)  $\Delta\lambda$ , welche der Differenz aus Emissionswellenlänge  $\lambda_{em}$  und Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$  entspricht, der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ , welcher den Anteil der bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$  absorbierten Strahlung widerspiegelt, die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$ , welche den Quotienten aus der Anzahl emittierter zu absorbierten Photonen entspricht, und die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$ , welche der mittleren Zeit entspricht, in der das Molekül in seinem angeregtem Zustand verharrt, ehe es durch die Emission eines Lichtquants in seinen Grundzustand übergeht.

**[0004]** Wünschenswert, insbesondere in Hinblick auf biologische Anwendungen, sind eine große Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$ , um mit der Anregungsstrahlung möglichst tief in biologische Proben eindringen zu können, ein großer Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ , damit möglichst viel des eingestrahlt Lichts absorbiert wird, eine große Stokes-Verschiebung  $\Delta\lambda$ , um möglichst geringe Wechselwirkungen zwischen der Anregungs- und der Emissionsstrahlung zu beobachten, eine lange Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$ , um die kurzlebige natürliche Hintergrundfluoreszenz biologischer Gewebe ausblenden zu können, und schließlich eine große Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$ , um ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen. Die meisten bisher bekannten Fluoreszenzfarbstoffe weisen bei bestimmten Parametern Nachteile auf, so dass stets ein Bedarf an neuen Fluoreszenzfarbstoffen besteht.

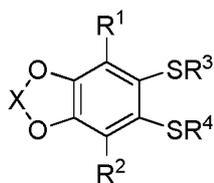
**[0005]** EP 2 399 913 B1 beschreibt einen Fluoreszenzfarbstoff auf Basis eines 1,2,4,5-Tetrahydroxybenzolderivats mit langer Fluoreszenzlebensdauer und großer Stokes-Verschiebung.

**[0006]** DE 10 2017 122 275 A1 beschreibt einen Fluoreszenzfarbstoff auf Basis eines Benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dithiol)-derivats mit großen Emissions- und Anregungswellenlängen.

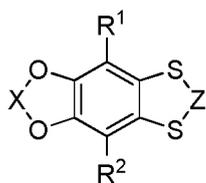
**[0007]** Es besteht ein anhaltender Bedarf nach neuen Fluoreszenzfarbstoffen, sowie effizienteren Synthesemethoden. Insbesondere sollten die Farbstoffe sowohl große Emissions- und Anregungswellenlängen als auch eine lange Fluoreszenzlebensdauer und eine große Stokes-Verschiebung aufweisen.

### Zusammenfassung der Erfindung

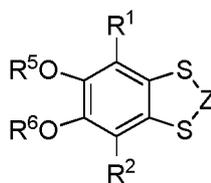
**[0008]** Es wird eine neue Gruppe von Fluoreszenzfarbstoffen bereitgestellt, deren spektrale Eigenschaften insbesondere den oben genannten Erfordernissen in Hinblick auf biologische Anwendungen genügen. Erfindungsgemäße Fluoreszenzfarbstoffe umfassen Derivate die allgemeinen Formeln (I), (II), (III), (IV) (im Folgenden 1,2-S<sup>2</sup>-DBD-Fluoreszenzfarbstoffe genannt):



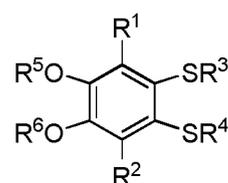
(I)



(II)

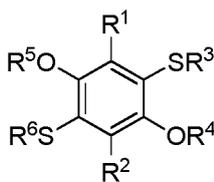


(III)

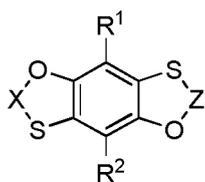


(IV)

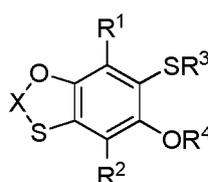
**[0009]** Zudem umfassen die erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe Derivate der allgemeinen Formeln (V), (VI) und (VII) (im Folgenden 1,4-S<sup>2</sup>-DBD-Fluoreszenzfarbstoffe genannt):



(V)

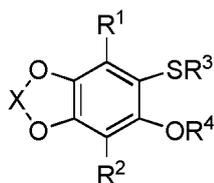


(VI)

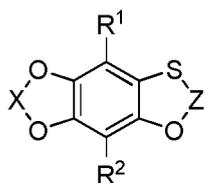


(VII)

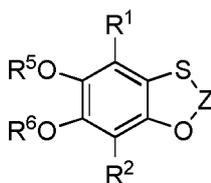
**[0010]** Des Weiteren umfassen die erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe Derivate der allgemeinen Formeln (VIII), (IX), (X) und (XI) (im Folgenden S<sup>1</sup>-DBD-Fluoreszenzfarbstoffe genannt):



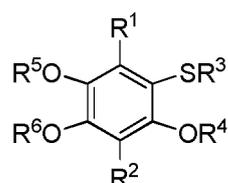
(VIII)



(IX)



(X)



(XI)

**[0011]** Die Reste R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> in den zuvor genannten Formeln sind aus der Gruppe umfassend: Wasserstoff, Nitril, Nitro, Formyl, Carboxyl, substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Acylalkyl, substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> Acylaryl, substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Acyloxy, substituiertes oder unsubstituierter C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Ester, substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Amid und substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Alkoxy unabhängig voneinander ausgewählt. Zudem sind die Reste R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe umfassend: Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Alkyl, substituiertes oder unsubstituierter C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Alkylether und substituiertes oder unsubstituiertes C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> Aryl. Die (ringbildenden) Reste Z und X sind unabhängig voneinander ausgewählt aus einem substituierten oder unsubstituierten Methylen oder einem substituierten oder unsubstituierten Ethan-1,2-diyl, wobei in den Formeln (I), (II), (III), (VI), (VII), (VIII), (IX) und (X) bei Z und X das substituierte Methylen und das substituierte Ethan-1,2-diyl mit mindestens einem substituierten oder unsubstituierten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> Alkyl und/oder mit einem substituierten oder unsubstituierten C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Ester substituiert sind.

**[0012]** Die neuartigen Fluoreszenzfarbstoffe weisen entweder zwei Sauerstoffatome und zwei Schwefelatome auf (im Folgenden als S<sup>2</sup>-DBD bezeichnet) oder drei Sauerstoffatome und ein Schwefelatome (im Folgenden als S<sup>1</sup>-DBD bezeichnet). Die neuartige Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen bietet im Vergleich zu den bereits bekannten [1,3]-Dioxolo[4.5-f]benzodioxol-Fluoreszenzfarbstoffen (kurz DBD) und [1,3]-Dithiolo[4.5-f]benzodithiolo-Fluoreszenzfarbstoffen (kurz S<sup>4</sup>-DBD) unter anderem hohe Anregungs- und Emissionswellenlängen ohne nennenswerte Verringerung der Stokes-Verschiebung. Somit konnte der Nachteil einer verringerten Stokes-Verschiebung, welche durch die vollständige Substitution der Sauerstoffatome des DBD durch Schwefel (vgl. S<sup>4</sup>-DBD) hervorgerufen wurde, nahezu verlustfrei behoben werden.

**[0013]** Die erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe sind somit besonders für Anwendungen im Bereich der Biologie und Biochemie geeignet (z.B. für die Strukturaufklärung komplexer Proteine oder Zellen), die ein be-

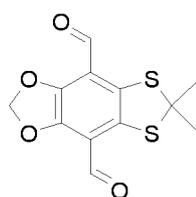
sonders klares Signal und das tiefe Eindringen in die biologische Probe erfordern, wobei die Klarheit des Signals durch die geringe Wechselwirkung zwischen Anregungs- und Emissionslicht gewährleistet wird.

**[0014]** Besonders bevorzugt können Z und X in den Formeln (I), (II), (III), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) einem substituierten oder unsubstituierten Methylen entsprechen. Zudem können Z und X in den Formeln (I), (II), (III), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) vorzugsweise gleich ausgewählt sein.

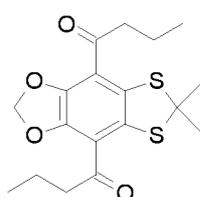
**[0015]** In einer bevorzugten Ausführungsform können R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> gleich (identisch) ausgewählt sein.

**[0016]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das substituierte C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Acylalkyl ein Trifluoraethyl umfassen. Auch kann beispielsweise das unsubstituierte C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Acylalkyl einen Rest aus der Gruppe: Acetyl, Propionyl, Butyryl und Valeryl umfassen.

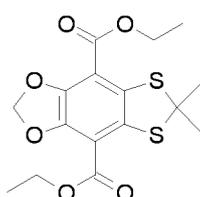
**[0017]** Die folgenden Derivate stellen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe dar:



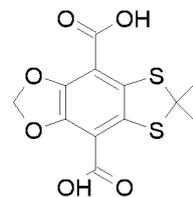
(II-1)



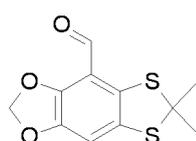
(II-2)



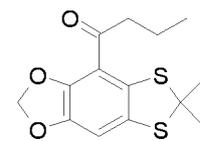
(II-3)



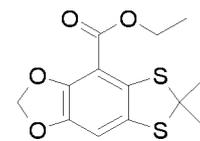
(II-4)



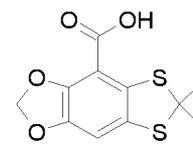
(II-5)



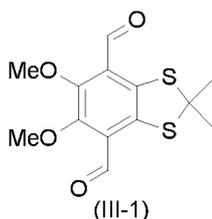
(II-6)



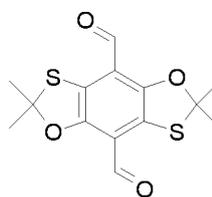
(II-7)



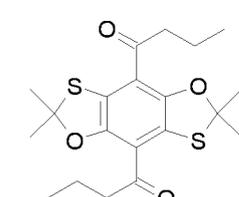
(II-8)



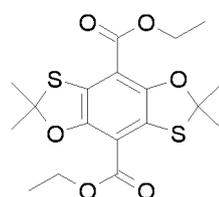
(III-1)



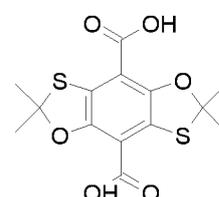
(VI-1)



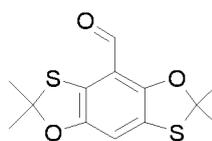
(VI-2)



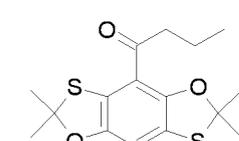
(VI-3)



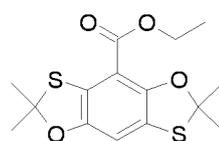
(VI-4)



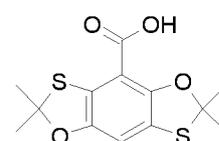
(VI-5)



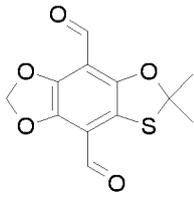
(VI-6)



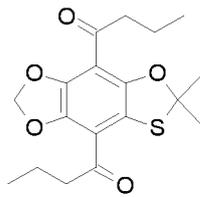
(VI-7)



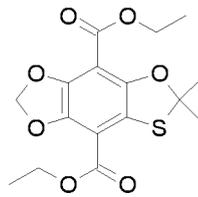
(VI-8)



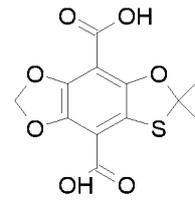
(IX-1)



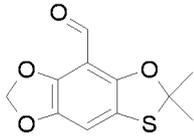
(IX-2)



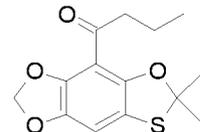
(IX-3)



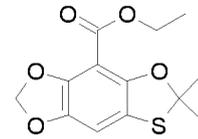
(IX-4)



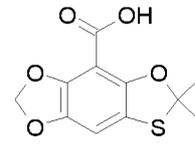
(IX-5)



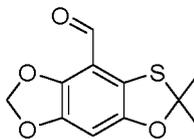
(IX-6)



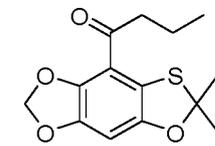
(IX-7)



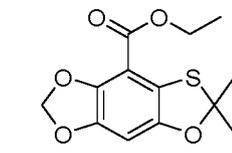
(IX-8)



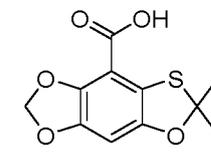
(IX-9)



(IX-10)

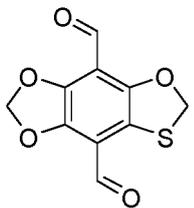


(IX-11)



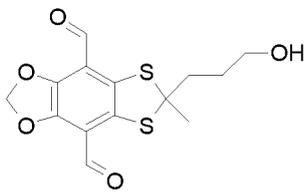
(IX-12)

und

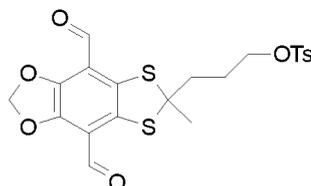


(IX-13)

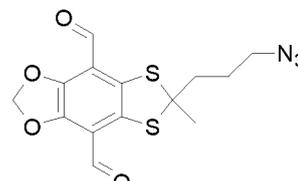
**[0018]** Weitere besonders bevorzugte Ausführungsformen stellen die folgenden Derivate der erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe dar:



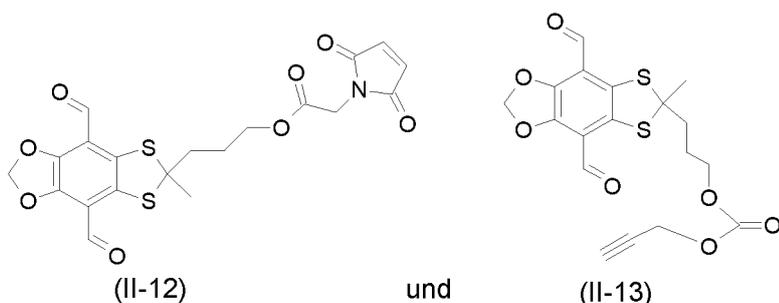
(II-9)



(II-10)



(II-11)



**[0019]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Offenbarung betrifft ein Konjugat umfassend einen Fluoreszenzfarbstoff wie zuvor beschrieben und ein an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Biomolekül oder eine an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Zelle. Hierbei kann das Biomolekül vorzugsweise aus der Gruppe Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und Lipide ausgewählt sein.

#### Figurenliste

**[0020]** Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels und dazugehöriger Zeichnungen näher erläutert. Die Figuren zeigen:

**Fig. 1 - Fig. 4** Balkendiagramme zu photophysikalischen Daten von zwei bekannten und drei neuen Fluoreszenzfarbstoffe (II-1), ( $S^4$ -DBD-1), (DBD-1), (VI-1) und (IX-13) in Acetonitril;

**Fig. 5A/Fig. 5B** Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs (II-1) gemessen in Acetonitril;

**Fig. 6A/Fig. 6B** Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs (VI-1) gemessen in Acetonitril; und

**Fig. 7A/Fig. 7B** Absorptions- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs (IX-13) gemessen in Acetonitril.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0021]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „ $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl“ ein linearer oder verzweigter Alkylrest verstanden sein, der die allgemeine Formel  $C_nH_{2n+1}$  aufweist, wobei  $n = 1$  bis 20 bedeutet.  $C_1$ - $C_5$  Alkyl umfasst beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 2,2-Dimethylpropyl und 1-Ethylpropyl. Beispiele für Alkylreste mit  $n \geq 6$  umfassen n-Hexan, n-Heptan, n-Octan, n-Nonan, n-Decan, 1-Methylpentyl, 1-Methylhexyl, 1-Methylheptyl, 1-Methyloctyl, 1-Methylnonyl, 1-Methyldecanyl, 1-Ethylbutyl, 1-Ethylpentyl, 1-Ethylhexyl, 1-Ethylheptyl, 1-Ethylloctyl, 1-Ethylnonyl, 1-Ethyldecanyl, 2-Methylpentyl, 2-Methylhexyl, 2-Methylheptyl, 2-Methyloctyl, 2-Methylnonyl, 2-Methyldecanyl, 2-Ethylpropyl, 2-Ethylbutyl, 2-Ethylpentyl, 2-Ethylhexyl, 2-Ethylheptyl, 2-Ethylloctyl, 2-Ethylnonyl, 2-Ethyldecanyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,1-Dimethylpentyl, 1,1-Dimethylhexyl, 1,1-Dimethylheptyl, 1,1-Dimethyloctyl, 1,1-Dimethylnonyl, 1,1-Dimethyldecanyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylpentyl, 1,2-Dimethylhexyl, 1,2-Dimethylheptyl, 1,2-Dimethyloctyl, 1,2-Dimethylnonyl, 1,2-Dimethyldecanyl, 2-Ethyl-1-methylbutyl, 2-Ethyl-1-methylpentyl, 2-Ethyl-1-methylhexyl, 2-Ethyl-1-methylheptyl, 2-Ethyl-1-methyloctyl, 2-Ethyl-1-methylnonyl, 2-Ethyl-1-methyldecanyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylbutyl, 1-Ethyl-2-methylpentyl, 1-Ethyl-2-methylhexyl, 1-Ethyl-2-methylheptyl, 1-Ethyl-2-methyloctyl, 1-Ethyl-2-methylnonyl und 1-Ethyl-2-methyldecanyl.

**[0022]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „ $C_2$ - $C_{20}$  Acylalkyl“ ein linearer oder verzweigter Alkylrest der oben wiedergegebenen Bedeutung verstanden sein, der über eine Carbonylgruppe an den Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebunden ist. Beispiele umfassen Acetyl, Propionyl, Butyryl und Valeryl.

**[0023]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „ $C_6$ - $C_{20}$  Aryl“ ein aromatischer Rest mit 6 bis 20 Kohlenstoffatomen verstanden. Beispiele umfassen Phenyl, Pentalenyl, Indenyl, Naphthyl, Biphenyl, Fluorenyl, Phenanthrenyl, Pyrenyl und Perylenyl. Die Arylreste können ihrerseits einfach oder mehrfach mit  $C_1$ - $C_5$ Alkylresten der oben wiedergegebenen Bedeutung substituiert sein. Beispiele für derartig substituierte Arylreste umfassen Toly, Xylyl, Pseudocumyl und Mesityl.

**[0024]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> Acylaryl“ ein Arylrest der oben wiedergegebenen Bedeutung verstanden sein, der über eine Carbonylgruppe an den Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebunden ist. Ein Beispiel ist Benzoyl.

**[0025]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Acyloxy“ ein über das Sauerstoffatom an den Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebundener Ester verstanden sein, dessen Carbonylkohlenstoff-gebundener verzweigter oder unverzweigter Alkylrest 1 bis 19 Kohlenstoffatome umfasst. Ein Beispiel ist Acetyloxy.

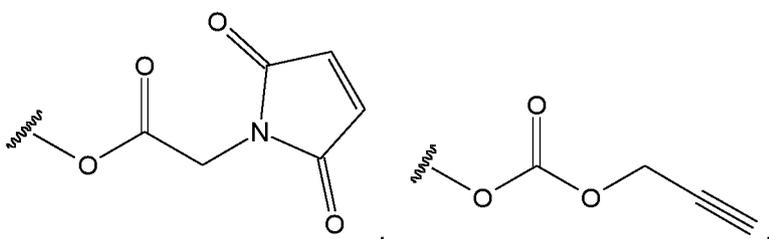
**[0026]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Ester“ ein über den Carbonylkohlenstoff an den Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebundener Ester verstanden sein. Beispiele umfassen Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Propoxycarbonyl, Butoxycarbonyl, Pentoxycarbonyl und [(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl.

**[0027]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Amid“ ein über den Carbonylkohlenstoff an den Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebundenes Carbonsäureamid verstanden sein, dessen Stickstoffatom-gebundener verzweigter oder unverzweigter Alkylrest 1 bis 19 Kohlenstoffatome umfasst. Beispiele umfassen Methylaminocarbonyl, Ethylaminocarbonyl, Propylaminocarbonyl, Butylaminocarbonyl und Pentylaminocarbonyl.

**[0028]** Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter „C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> Alkoxy“ eine funktionelle Gruppe verstanden, die auf einer mit einem Sauerstoffatom verbundenen linearen oder verzweigten Alkylgruppe der oben wiedergegebenen Bedeutung beruht. Beispiele umfassen Methoxy und Ethoxy.

**[0029]** Der Ausdruck „substituiert“, wie er hierin in Bezug auf Acylalkyl, Acylaryl, Acyloxy, Ester, Amid, Alkoxy, Alkylether und Aryl verwendet wird, bezieht sich darauf, dass in diesen Gruppen ein, mehrere oder alle Wasserstoffatome durch Fluor, Chlor, Brom und Iod ersetzt sind.

**[0030]** Der Ausdruck „substituiert“, wie er hierin in Bezug auf Alkyl verwendet wird, bezieht sich darauf, dass in dieser Gruppe mindestens ein Wasserstoffatom durch Substituenten ausgewählt aus der Gruppe umfassend: Hydroxy, Tosylat (p-Toluolsulfonsäureester), Azid,

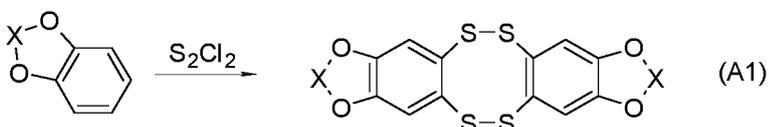


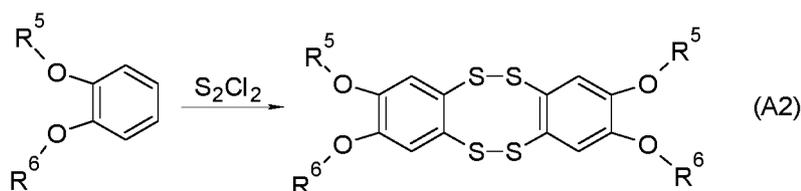
Fluor, Chlor, Brom und Iod, ersetzt ist.

**[0031]** Der Ausdruck „substituiert“, wie er hierin in Bezug auf Methylen und Ethan-1,2-diyl der Reste Z und X verwendet wird, bezieht sich darauf, dass in diesen Gruppen ein, mehrere oder alle Wasserstoffatome durch substituierte oder unsubstituierte C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> Alkyl (wie zuvor definiert) oder substituierte oder unsubstituierte C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> Ester (wie zuvor definiert), ersetzt sind.

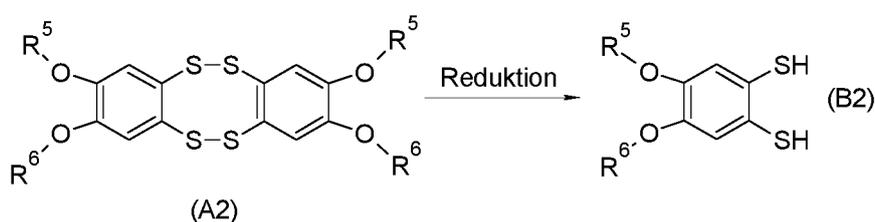
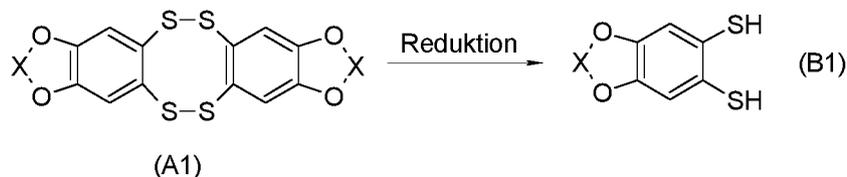
#### Allgemeine Synthesevorschrift

**[0032]** Nachfolgend wird ein Verfahren zur Synthese der erfindungsgemäßen Fluoreszenzfarbstoffe beschrieben. Das Verfahren umfasst den Schritt A), die Umsetzung eines Brenzcatechin-Derivats (z.B. Veratrol oder 1,2-Methylenedioxybenzol) mit S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zur Bildung eines ersten Intermediates gemäß Formel (A1) oder (A2):



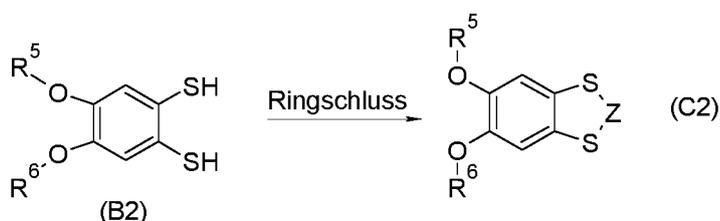
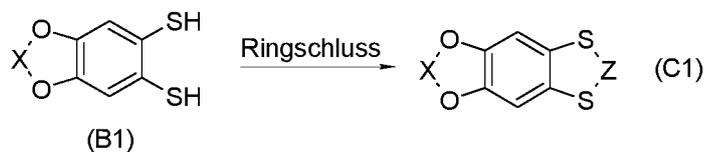


und den Schritt B), der anschließenden Reduktion des ersten Intermediates aus Schritt A zur Bildung eines zweiten Intermediates gemäß Formel (B1) oder (B2):



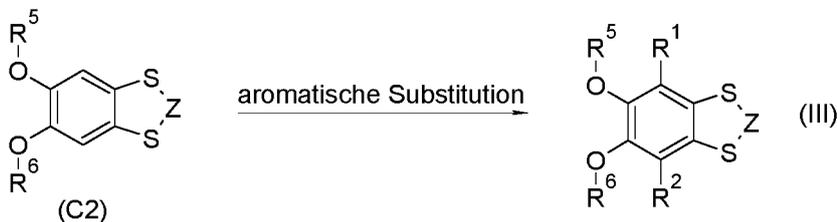
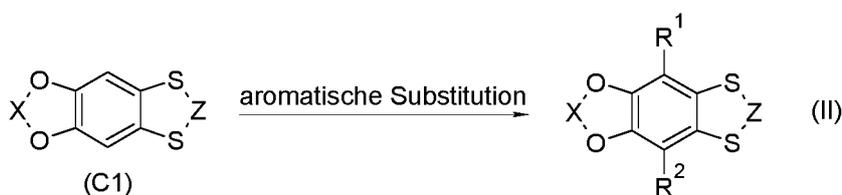
**[0033]** Im genannten Verfahren sind die Reste  $R^5$  und  $R^6$  aus der Gruppe, umfassend Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Alkylether und substituiertes oder unsubstituiertes  $C_6$ - $C_{20}$  Aryl, unabhängig voneinander ausgewählt. Zudem ist X ausgewählt aus einem substituierten oder unsubstituierten Methylen oder einem substituierten oder unsubstituierten Ethan-1,2-diyl, wobei für X das substituierte Methylen und das substituierte Ethan-1,2-diyl mit mindestens einem substituierten oder unsubstituierten  $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl und/oder mit einem substituierten oder unsubstituierten  $C_2$ - $C_{20}$  Ester substituiert sind. Im Reduktionsschritt (Reduktion in Schritt B) können beispielsweise Reduktionsmittel umfassend  $NaBH_4$ ,  $KBH_4$ ,  $NMe_4BH_4$  und  $NaAlH_4$  verwendet werden. Vorzugsweise kann  $NaBH_4$  verwendet werden.

**[0034]** Ferner kann das zuvor genannte Verfahren die folgenden weiteren Schritte C) und D) umfassen. Schritt C) entspricht einer Ringschlussreaktion des zweiten Intermediates aus Schritt B zur Bildung eines dritten Intermediates gemäß Formel (C1) oder (C2):



**[0035]** Die Ringschlussreaktion kann eine  $S_N$ -Reaktion oder Acetalisierung umfassen. Beispiele für die Ringschlussreaktion können die Umsetzung mit  $CH_2BrCl$  oder mit Aceton umfassen.

**[0036]** Schritt D) entspricht einer (elektrophilen) aromatischen Substitution am dritten Intermediat aus Schritt C:

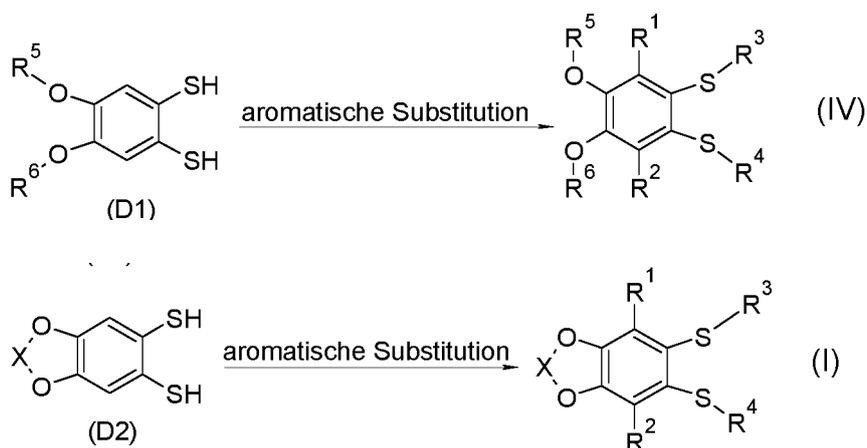


**[0037]** In den Verfahrensschritten B und D sind die Reste  $R^1$  und  $R^2$  aus der Gruppe umfassend Wasserstoff, Nitril, Nitro, Formyl, Carboxyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Acylalkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_5$ - $C_{20}$  Acylaryl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Acyloxy, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Ester, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Amid und substituiertes oder unsubstituiertes  $C_1$ - $C_{15}$  Alkoxy unabhängig voneinander ausgewählt. Zudem sind die Reste  $R^5$  und  $R^6$  unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe umfassend: Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Alkylether und substituiertes oder unsubstituiertes  $C_6$ - $C_{20}$  Aryl. Die Reste Z und X sind unabhängig voneinander ausgewählt aus einem substituierten oder unsubstituierten Methylen oder einem substituierten oder unsubstituierten Ethan-1,2-diyl, wobei für Z und X das substituierte Methylen und das substituierte Ethan-1,2-diyl mit mindestens einem substituierten oder unsubstituierten  $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl und/oder mit einem substituierten oder unsubstituierten  $C_2$ - $C_{20}$  Ester substituiert sind. In einer Ausführungsform kann die aromatische Substitution mittels Dimethylformamid (DMF) und einer Lithiumorganyl-Verbindung (z.B. n-Butyllithium) erfolgen. Weitere Ausführungsformen der (elektrophilen) aromatischen Substitution können Friedel-Crafts-Alkylierungen, Friedel-Crafts-Acylierungen und Nitrierung umfassen.

**[0038]** Ferner kann das Verfahren, ausgehend von den Intermediaten aus Schritt B, die weiteren Schritte E) und F) umfassen. Schritt E) entspricht einer S-Funktionalisierung (Funktionalisierung der Thiol-Gruppen) des zweiten Intermediates aus Schritt B zur Bildung eines vierten Intermediates gemäß Formel (D1) oder (D2):



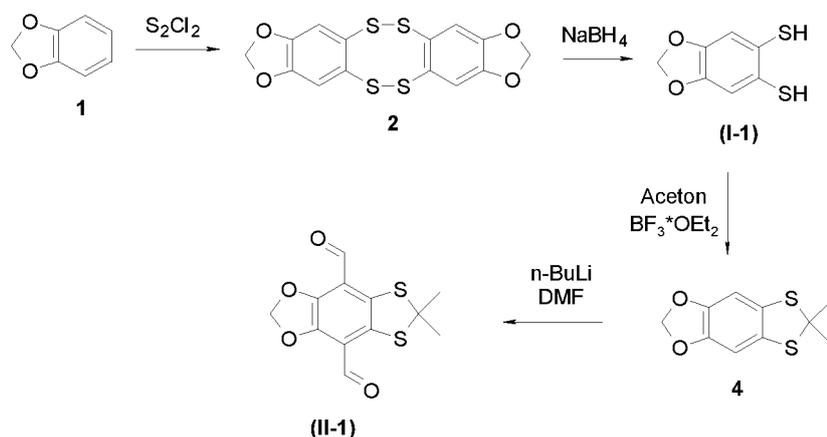
**[0039]** Die S-Funktionalisierung kann beispielsweise Alkylierungen am Schwefelatom (z.B. mit Methyljodid, Methyltriflat oder weiteren Alkylreagenzien) umfassen. Schritt F) entspricht einer (elektrophilen) aromatischen Substitution am vierten Intermediat aus Schritt E):



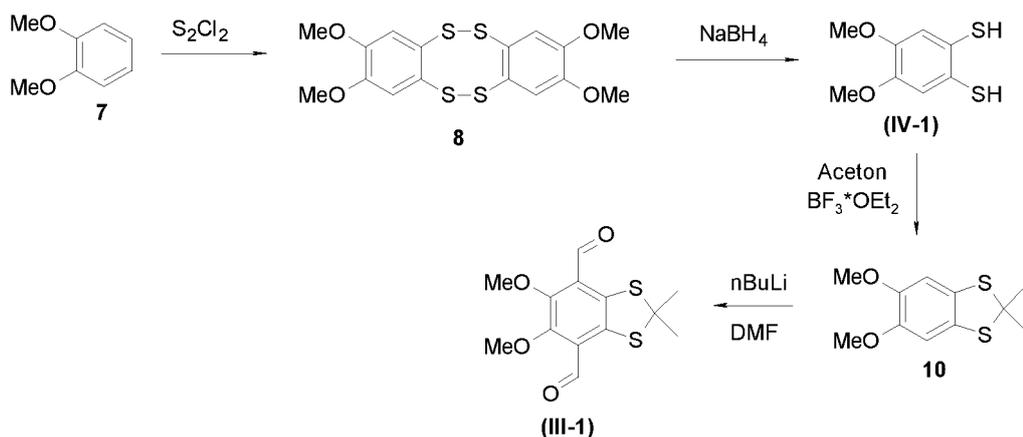
**[0040]** In den Verfahrensschritten E und F sind die Reste  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  aus der Gruppe umfassend Wasserstoff, Nitril, Nitro, Formyl, Carboxyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$  Acylalkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_5\text{-C}_{20}$  Acylaryl, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$  Acyloxy, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$  Ester, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$  Amid und substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_1\text{-C}_{15}$  Alkoxy unabhängig voneinander ausgewählt. Zudem sind die Reste  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  und  $\text{R}^6$  unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe umfassend: Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$  Alkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$  Alkylether und substituiertes oder unsubstituiertes  $\text{C}_6\text{-C}_{20}$  Aryl. Der Rest X ist ausgewählt aus einem substituierten oder unsubstituierten Methylen oder einem substituierten oder unsubstituierten Ethan-1,2-diyl, wobei für X das substituierte Methylen und das substituierte Ethan-1,2-diyl mit mindestens einem substituierten oder unsubstituierten  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$  Alkyl und/oder mit einem substituierten oder unsubstituierten  $\text{C}_2\text{-C}_{20}$  Ester substituiert sind.

**[0041]** Die Fluoreszenzfarbstoffe gemäß den Formeln (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII) und (IX) lassen sich durch das nachfolgende Syntheschema herstellen.

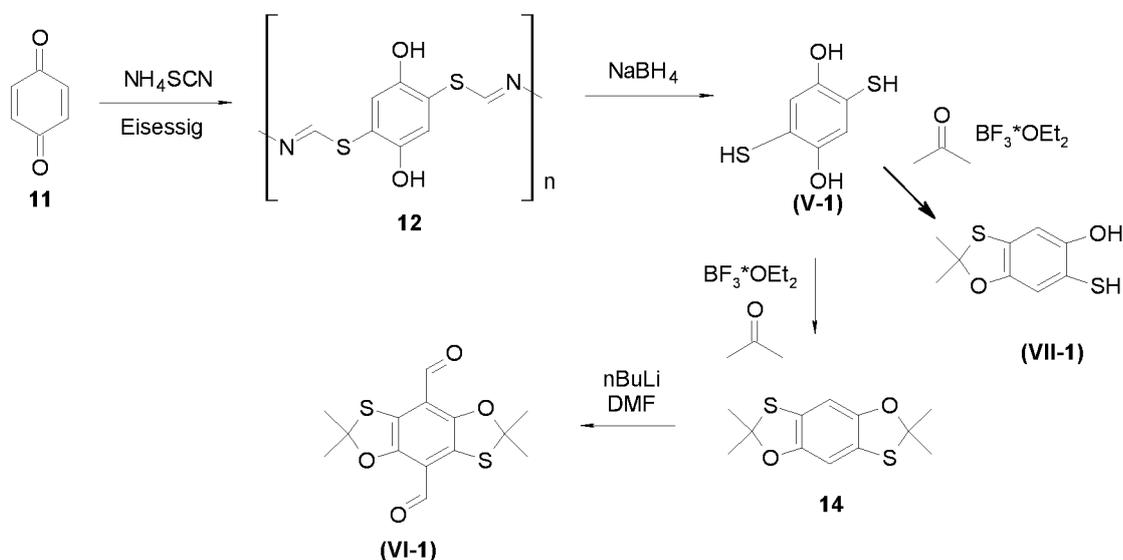
**[0042]** Exemplarisches Reaktionsschema zur Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe 1,2-S<sup>2</sup> gemäß Formel (I) und (II):



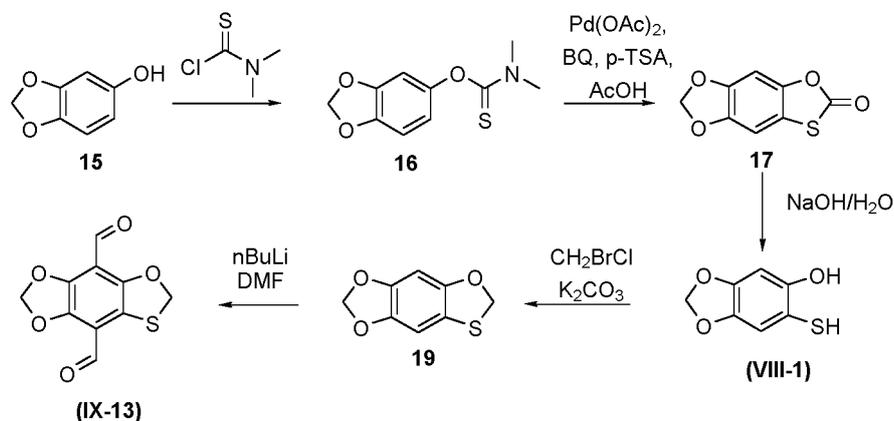
**[0043]** Exemplarisches Reaktionsschema zur Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe 1,2-S<sup>2</sup> gemäß Formel (III) und (IV):



**[0044]** Exemplarisches Reaktionsschema zur Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe 1,4-S<sup>2</sup> gemäß Formel (V) (VI) und (VII):



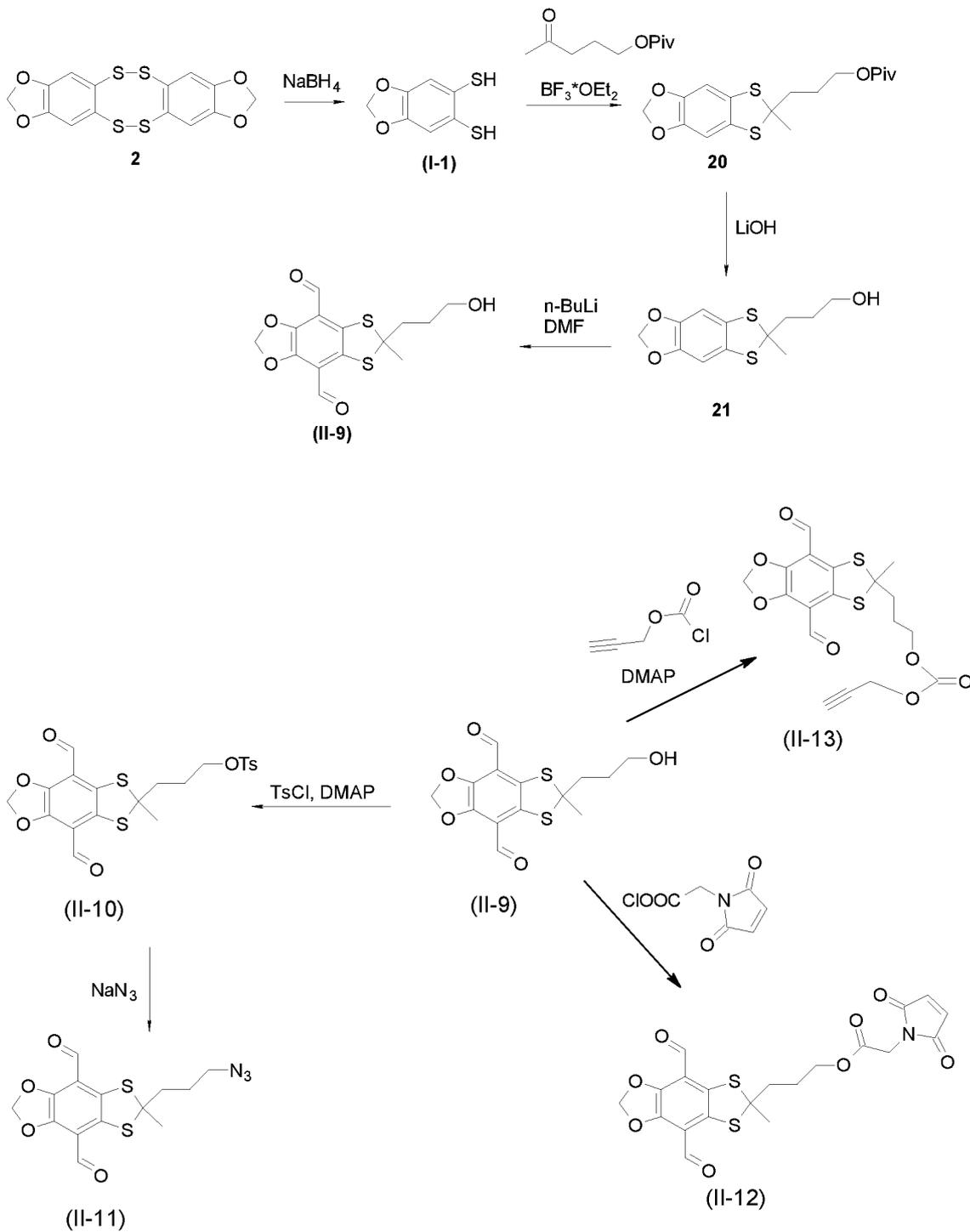
**[0045]** Exemplarisches Reaktionsschema zur Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe S<sup>1</sup> gemäß Formel (VIII), (IX), (X) und (XI):



#### Biofunktionalisierung

**[0046]** Die im folgenden Schema dargestellten Derivate (II-9) bis (11-13) eignen sich beispielsweise zur Koppelung mit den folgenden in Biomolekülen vorkommenden funktionellen Gruppen:

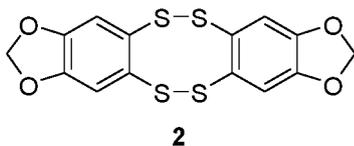
Carbonsäuren (vgl. II-9), Lysin, Methionin, N-Heterozyklen (vgl. 11-10), Alkine durch Click-Reaktion (vgl. II-11), Thiole wie Cystein (vgl. II-12), und Azide durch Click-Reaktion (vgl. II-13).



**[0047]** Die Funktionalisierung der Derivate durch Halogenatome kann beispielsweise ausgehend von 11-10 durch die Umsetzung mit Kaliumhalogeniden (Finkelstein-Reaktion) erfolgen.

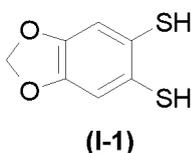
## Beispiel 1

## Benzo[2,3,8,9]dioxol-1,2,5,6-tetrathiocin



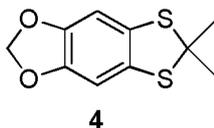
1,3-Benzodioxol (2 mL, 17.60 mmol, 1.0 eq.) wurden in 40 mL Eisessig vorgelegt, mit Schwefelmonochlorid versetzt (1.4 mL, 17.60 mmol, 1.0 eq.) und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene gelbe Feststoff wurde abgesaugt und mit 50 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum wurden 2.69 g von Verbindung 2 (83%, 7.30 mmol) als gelber Feststoff erhalten.

## Benzo[d][1,3]dioxol-5,6-dithiol



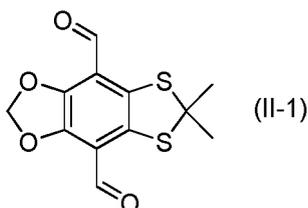
**[0048]** Es wurden (50 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq.) in trockenem DMF (15 mL) suspendiert und NaBH<sub>4</sub> (25 mg, 0.63 mmol, 5.0 eq.) zugegeben. Das gelbe Gemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und für 1 h auf 100 °C erhitzt. Nachdem die farblose Lösung abgekühlt war, wurde H<sub>2</sub>O (20 mL) zur Lösung gegeben und die Lösung mit DCM (20 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1M HCl auf pH = 2 eingestellt und erneut mit DCM (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und das Rohprodukt zweimal mit Toluol versetzt und jeweils das Lösungsmittel entfernt, sodass (I-1) als blass grünes Öl in 50 mg (quant., 0.25 mmol) isoliert wurde.

## 6,6-Dimethyl-[1,3]dithiolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol



**[0049]** Das Dithiol 3 (50 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) wurde in 10 mL trockenem DCM gelöst und Aceton (0.03 mL, 0.37 mmol, 1.5 eq.) sowie Bortrifluorid-diethyletherat (0.1 mL, 48 %, 0.37 mmol, 1.5 eq.) zugegeben. Die grünlich-klare Lösung wurde für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ist die Reaktion beendet worden. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit DCM (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 5:1) wurden 50 mg (50%, 0.20 mmol) von 4 als weißer Feststoff erhalten.

## 6,6-Dimethyl-[1,3]dithiolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-4,8-dicarbaldehyd

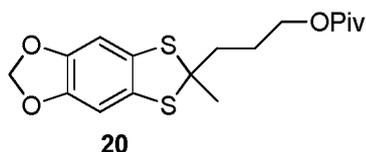


**[0050]** Verbindung 4 (50 mg, 0.22 mmol, 1 eq.) wurde in 3 mL trockenem Hexan suspendiert und mit TMEDA versetzt (0.07 mL, 0.44 mmol, 2.0 eq.). Anschließend wurde bei Raumtemperatur n-BuLi (0.19 mL, 2.5 M

in Hexan, 0.46 mmol, 2.1 eq.) zur Lösung gegeben und für 1 h gerührt. Nach Zugabe von trockenem DMF (0.42 mL, 0.55 mmol, 2.5 eq.) wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M HCl beendet, die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 3:1) wurden 36 mg (58%, 0.13 mmol) von Verbindung (II-1) als roter Feststoff erhalten.

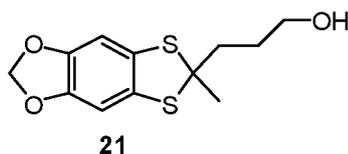
## Beispiel 2

## 3-(6-Methyl-[1,3]dithiolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-yl)propyl-pivalat



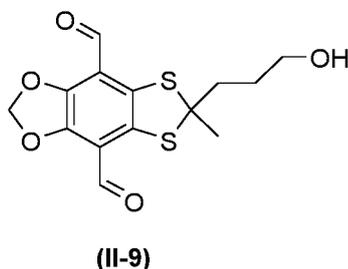
**[0051]** Zu einer Lösung aus Verbindung 2 (3.20 g, 17.18 mmol, 1.0 eq.) in 60 mL trockenem DCM wurden Aceton (6.08 mL, 25.77 mmol, 1.5 eq.) und Bortrifluorid-diethyletherat (6.80 mL, 48%ige Lsg., 25.77 mmol, 1.5 eq.) gegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen und die wässrige Phase einmal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 10:1) wurden 3.30 g von Verbindung 20 (55%, 9.31 mmol) als weißer Feststoff erhalten.

## 3-(6-Methyl-[1,3]dithiolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-yl)propan-1-ol



**[0052]** Verbindung 20 (1.71 g, 4.82 mmol, 1.0 eq.) wurden in 100 mL Methanol gelöst und Lithiumhydroxid-Monohydrat (0.61 g, 14.47 mmol, 3.0 eq.) zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1M HCl und Brine gewaschen sowie mit  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (PE:EE3:1) gereinigt. Es wurden 1.20 g von Verbindung 21 (92%, 4.44 mmol) als farbloses Öl erhalten.

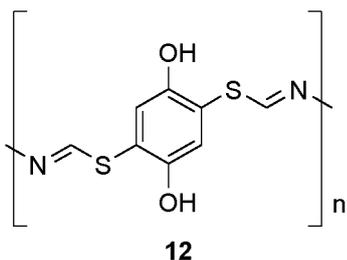
## 6-(3-Hydroxypropyl)-6-methyl-[1,3]dithiolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-4,8-dicarbaldehyd



**[0053]** Eine Lösung aus 21 (100 mg, 0.37 mmol, 1.0 eq.) in 5 mL trockenem Hexan und TMEDA (0.12 mL, 0.77 mmol, 2.1 eq.) wurde auf 0 °C gekühlt und mit n-BuLi (0.52 mL, 2.5 M in Hexan, 1.29 mmol, 3.5 eq.) versetzt und für 1 h gerührt. Nach Zugabe von DMF (0.07 mL, 0.92 mmol, 2.5 eq.) wurde erneut 1 h bei 0 °C gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 1M HCl (15 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Nachdem Trocknen mit  $MgSO_4$  wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 1:1) gereinigt. Es wurden 42 mg von Verbindung (II-9) (35%, 0.13 mmol) als roter Feststoff erhalten.

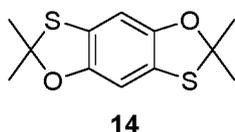
## Beispiel 3

## Polythiocyanathydrochinon



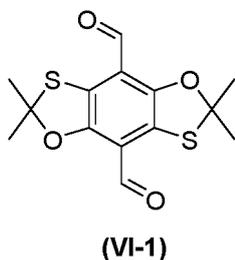
**[0054]** Benzochinon (1.0 g, 9.25 mmol, 1.0 eq.) und Ammoniumthiocyanat (1.76 g, 23.1 mmol, 2.5 eq.) wurden in 50 mL Eisessig gelöst und für 1 h bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde Wasser (50 mL) zugegeben und das Gemisch zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit Wasser und mehrfach mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das braune Öl wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

## 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d:4,5-d']bis[1,3]oxathiol



**[0055]** Verbindung 12 (1.00 g, 4.46 mmol, 1.0 eq.) wurde in 100 mL trockenem DMF gelöst und mit NaBH<sub>4</sub> (0.84 g, 22.30 mmol, 5.0 eq.) versetzt. Das Gemisch wurde für 2 h bei 100 °C gerührt. Unter Eiskühlung wurde die Lösung mit 1M HCL auf pH = 2 eingestellt und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und 0.10 g des blass-grüne Rückstands in 50 mL trockenem DCM gelöst. Nach Zugabe von Aceton (0.06 mL, 0.86 mmol, 1.5 eq.) und Bortrifluoriddiethyletherat (0.23 mL, 48%-ige Lsg., 0.86 mmol, 1.5 eq.) wurde über Nacht gerührt. Gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. wurde zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, eingeeengt und mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 10:1) gereinigt. Es wurde 10 mg von Verbindung 14 (1%, 0.04 mmol) als weißer Feststoff erhalten.

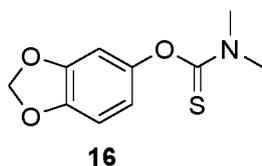
## 2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]oxathiole)-4,8-dicarbaldehyd



**[0056]** Zu einer Lösung aus 14 (10 mg, 0.04 mmol, 1.0 eq.) und TMEDA (7 µL, 0.1 mmol, 2.5 eq.) in 2 mL trockenem Hexan wurde bei 0 °C n-BuLi (35 µL, 2.5 M in Hexan, 0.08 mmol, 2.1 eq.) gegeben und für 1 h gerührt. Anschließend wurde trockenes DMF (8 µL, 0.1 mmol, 2.5 eq.) zugegeben und eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 1M HCl wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 10:1) wurde 1 mg von Verbindung VI-1 (10%, 0.004 mmol) als roter Feststoff erhalten.

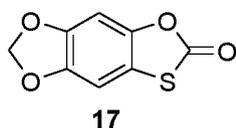
## Beispiel 4

## O-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl) dimethylcarbamothioat



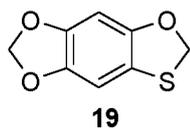
**[0057]** Sesamol (1.0 g, 7.24 mmol, 1.0 eq.) wurde in 10 mL trockenem DMF vorgelegt und nach Zugabe von Dimethylthiocarbamoylchlorid (1.34 g, 10.9 mmol, 1.5 eq.) und DABCO (1.22 g, 10.9 mmol, 1.5 eq.) für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 mL Wasser und 50 mL Ethylacetat wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase weitere zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Brine gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 3:1) gereinigt und 1.53 g von Verbindung 16 (94%, 6.79 mmol) als farbloses Öl erhalten.

## [1,3]Dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]oxathiol-6-on

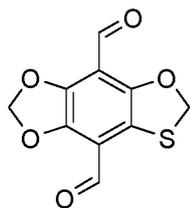


**[0058]** Zu einer Mischung aus 4 mL Eisessig und 4 mL Toluol wurden 16 (1.0 g, 4.44 mmol, 1.0 eq.), p-Benzochinon (0.53 g, 4.88 mmol, 1.1 eq.), p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (0.08 mg, 0.44 mmol, 0.1 eq.) und Palladium(II)-acetat (0.05 mg, 0.22 mmol, 0.05 eq.) gegeben und bei Raumtemperatur für 10 min, sowie weitere 14 h bei 120 °C gerührt. Aus der schwarzen Suspension wurden alle flüchtigen Verbindungen entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 3:1) gereinigt. Es wurden 0.18 g von Verbindung 17 (21%, 0.92 mmol) als weißer Feststoff isoliert.

## [1,3]Dioxolo[4',5':4,5]benzo[1,2-d][1,3]oxathiol



**[0059]** Verbindung 17 (130 mg, 0.66 mmol, 1.0 eq.) wurde in einem Gemisch aus 2 mL Methanol und 2 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von NaOH (79 mg, 1.99 mmol, 3.0 eq.) für 2 h bei 60 °C gerührt. Die nun klare Lösung wurde mit 1M HCl auf pH = 2 eingestellt und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeeengt und Rückstand in 4 mL DMF gelöst. Trockenes  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (446 mg, 3.23 mmol, 5.0 eq.) und Bromchlormethan wurden zugegeben und die Suspension für 3 h bei 90 °C sowie weitere 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels 1M HCl angesäuert (pH = 2) und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Brine gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Reinigung des Rohproduktes mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 10:1) wurde 52 mg von Verbindung 19 (45%, 0.285 mmol) als weißer Feststoff erhalten.

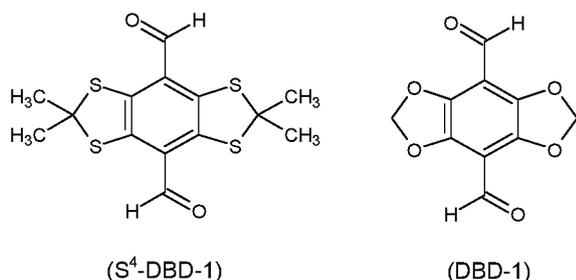


(IX-13)

**[0060]** Verbindung 19 (20 mg, 0.109 mmol, 1.0 eq.) wurde in 3 mL trockenem Hexan gelöst und nach Zugabe von TMEDA (0.03 mL, 0.219 mmol, 2.0 eq.) und n-BuLi (2.5 M in Hexan, 0.09 mL, 0.230 mmol, 2.1 eq.) für 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde trockenes DMF (0.02 mL, 0.275 mmol, 2.5 eq.) zur Lösung gegeben und eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M HCl beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde einmal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Nach Reinigung mittels Flash-Chromatographie (PE:EE 5:1) wurden 2 mg von Verbindung (IX-13) (7%, 0.01 mmol) als roter Feststoff erhalten.

#### Vergleichsbeispiele

**[0061]** Die neuartigen Fluoreszenzfarbstoffe (II-1), (VI) und (IX-13) zeigen verbesserte Fluoreszenzeigenschaften im Vergleich zu den folgenden strukturell verwandten Verbindungen (S<sup>4</sup>-DBD-1) und (DBD-1):

(S<sup>4</sup>-DBD-1)

(DBD-1)

**[0062]** In Tabelle 1 sind die ermittelten Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe zusammengefasst und die **Fig. 1 - Fig. 4** illustrieren die photophysikalischen Eigenschaften.

Tabelle 1: Photophysikalische Eigenschaften von (II-1), (S<sup>4</sup>-DBD-1), (DBD-1), (VI-1) und (IX-13) in Acetonitril.

Fluorophor	$\lambda_{\text{Abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{Em}}$ [nm]	$\Delta\lambda$ [nm]	$\tau_{\text{F}}$ [ns]	$\Phi_{\text{F}}$	$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
II-1	504	637	133	9.8	0.21	4760
S <sup>4</sup> -DBD-1	522	643	121	3.3	0.09	5091
DBD-1	475	609	134	17.7	0.32	2950
VI-1	520	620	100	16.8	0.52	4080
IX-13	500	618	118	17.9	0.43	4220

**[0063]** Die Vermessung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte in Acetonitril. Aus Tabelle 1 kann abgeleitet werden, dass der erfindungsgemäße Fluoreszenzfarbstoff besonders vorteilhaft, insbesondere durch die große Stokes-Verschiebung bei gleichzeitig großen Absorptions- und Emissionswellenlängen, gegenüber den bereits bekannten Verbindungen ist.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

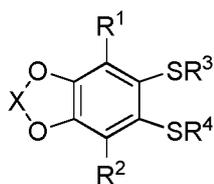
*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

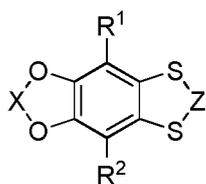
- EP 2399913 B1 [0005]
- DE 102017122275 A1 [0006]

## Patentansprüche

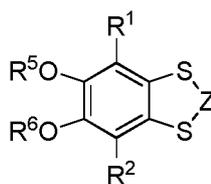
1. Ein Fluoreszenzfarbstoff gemäß der Formel (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX) und (X) und (XI):



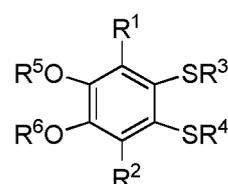
(I)



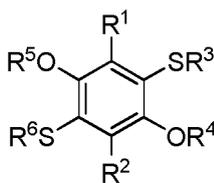
(II)



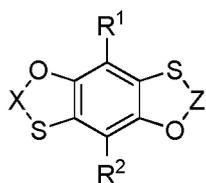
(III)



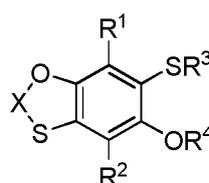
(IV)



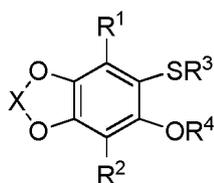
(V)



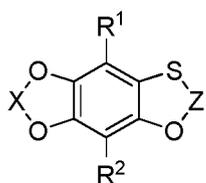
(VI)



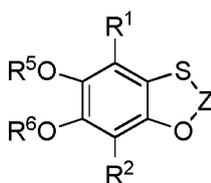
(VII)



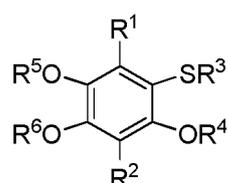
(VIII)



(IX)



(X)



(XI)

mit  $R^1$  und  $R^2$  unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe umfassend: Wasserstoff, Nitril, Nitro, Formyl, Carboxyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Acylalkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_5$ - $C_{20}$  Acylaryl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Acyloxy, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Ester, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Amid und substituiertes oder unsubstituiertes  $C_1$ - $C_{15}$  Alkoxy; mit  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  und  $R^6$  unabhängig voneinander ausgewählt aus der Gruppe umfassend: Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl, substituiertes oder unsubstituiertes  $C_2$ - $C_{20}$  Alkylether und substituiertes oder unsubstituiertes  $C_6$ - $C_{20}$  Aryl; und mit Z und X unabhängig voneinander ausgewählt aus einem substituierten oder unsubstituierten Methylen oder einem substituierten oder unsubstituierten Ethan-1,2-diyl, wobei in den Formeln (I), (II), (III), (VI), (VII), (VIII), (IX) und (X) bei Z und X das substituierte Methylen und das substituierte Ethan-1,2-diyl mit mindestens einem substituierten oder unsubstituierten  $C_1$ - $C_{20}$  Alkyl und/oder mit einem substituierten oder unsubstituierten  $C_2$ - $C_{20}$  Ester substituiert sind.

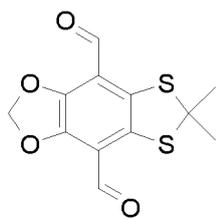
2. Fluoreszenzfarbstoff nach Anspruch 1, wobei Z und X in den Formeln (I), (II), (III), (VI), (VII), (VIII), (IX) und (X) einem substituierten oder unsubstituierten Methylen entspricht.

3. Fluoreszenzfarbstoff nach Anspruch 1, wobei in den Formeln (I), (II), (III), (VI), (VII), (VIII), (IX) und (X), Z und X gleich ausgewählt sind.

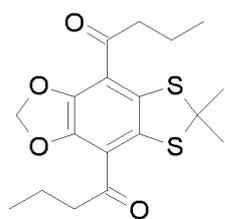
4. Fluoreszenzfarbstoff nach Anspruch 1, wobei  $R^1$  und  $R^2$  gleich ausgewählt sind.

5. Fluoreszenzfarbstoff nach Anspruch 1, wobei das substituierte  $C_2$ - $C_{20}$  Acylalkyl ein Trifluoracetyl umfasst, und wobei das unsubstituierte  $C_2$ - $C_{20}$  Acylalkyl einen Rest aus der Gruppe: Acetyl, Propionyl, Butyryl und Valeryl umfasst.

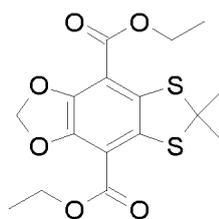
6. Fluoreszenzfarbstoff nach Anspruch 1 ausgewählt aus der Gruppe umfassend die Derivate:



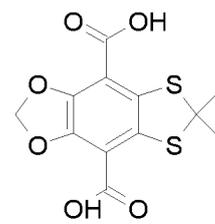
(II-1)



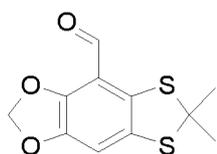
(II-2)



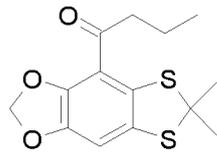
(II-3)



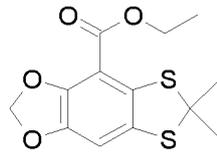
(II-4)



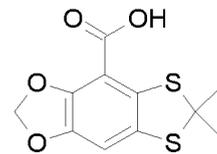
(II-5)



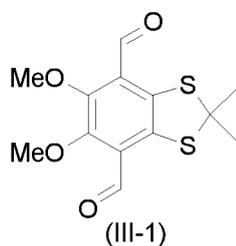
(II-6)



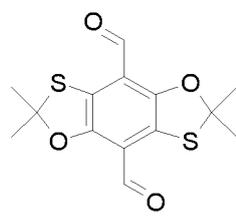
(II-7)



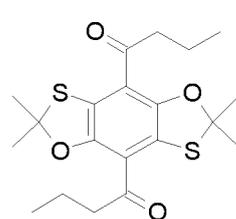
(II-8)



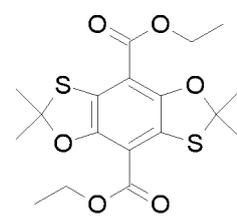
(III-1)



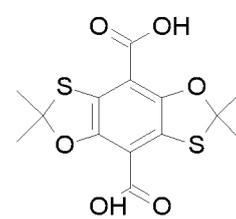
(VI-1)



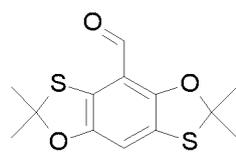
(VI-2)



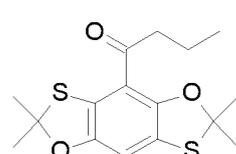
(VI-3)



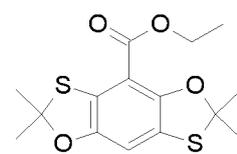
(VI-4)



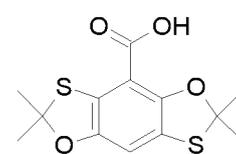
(VI-5)



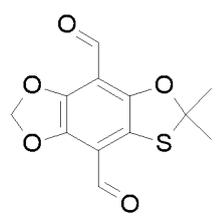
(VI-6)



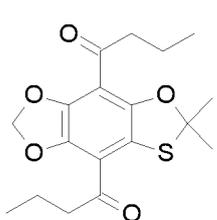
(VI-7)



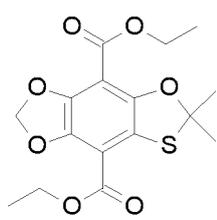
(VI-8)



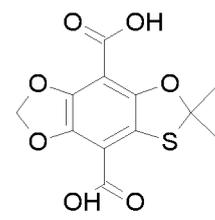
(IX-1)



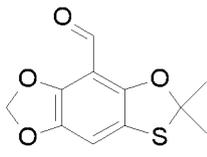
(IX-2)



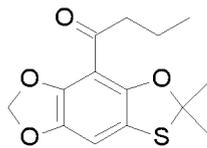
(IX-3)



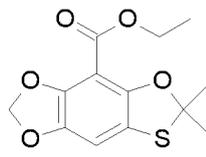
(IX-4)



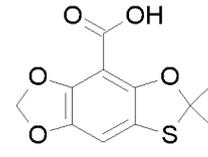
(IX-5)



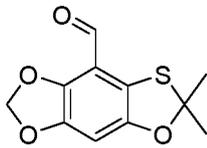
(IX-6)



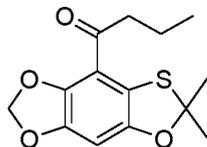
(IX-7)



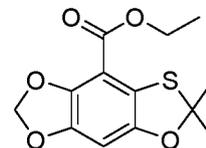
(IX-8)



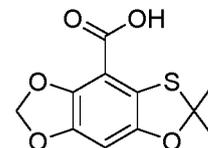
(IX-9)



(IX-10)

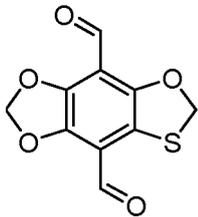


(IX-11)



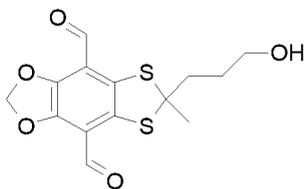
(IX-12)

und

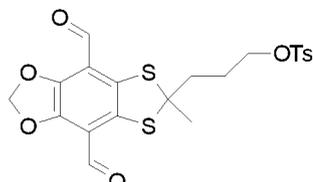


(IX-13)

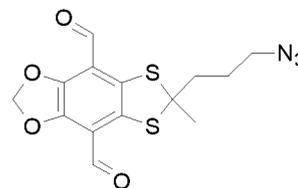
7. Fluoreszenzfarbstoff nach Anspruch 1 ausgewählt aus der Gruppe umfassend die Derivate:



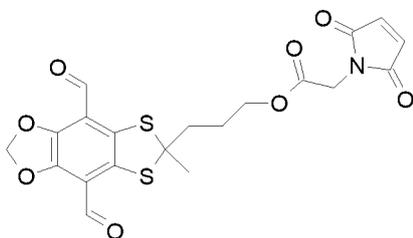
(II-9)



(II-10)

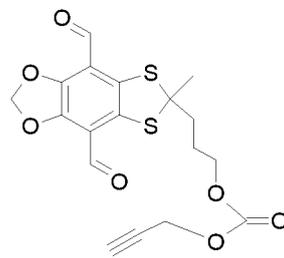


(II-11)



(II-12)

und



(II-13)

8. Konjugat umfassend einen Fluoreszenzfarbstoff gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 und ein an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Biomolekül oder eine an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Zelle.

9. Das Konjugat nach Anspruch 8, wobei das Biomolekül aus der Gruppe umfassend: Proteine, Peptide, Nucleinsäuren und Lipide ausgewählt ist.

Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

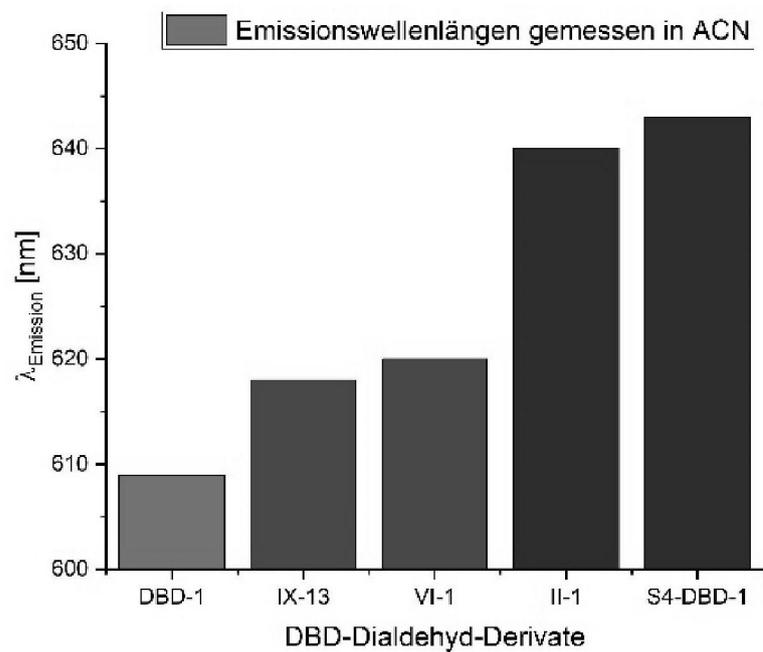


Fig. 1

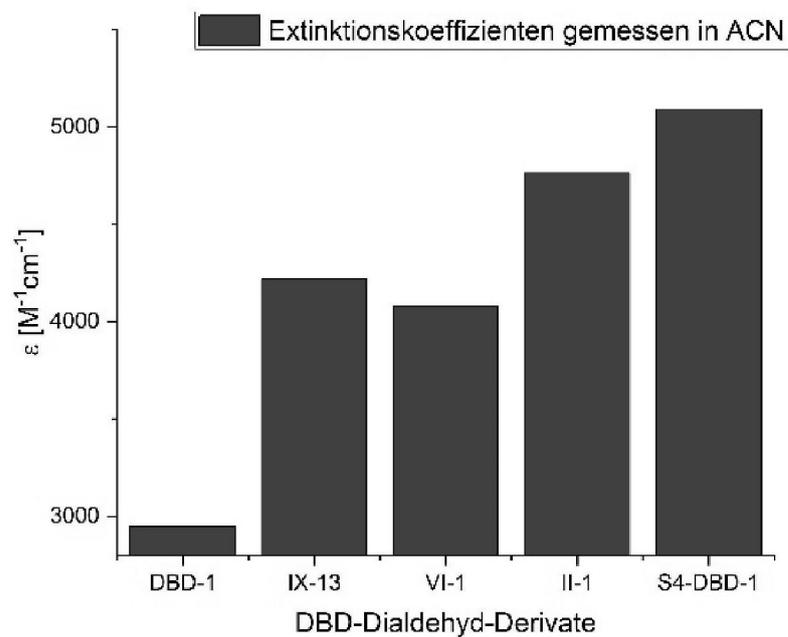


Fig. 2

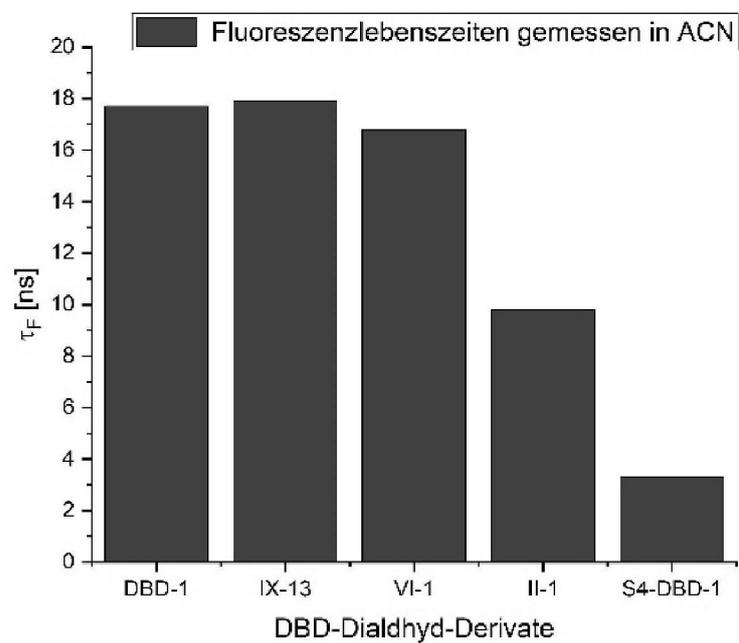


Fig. 3

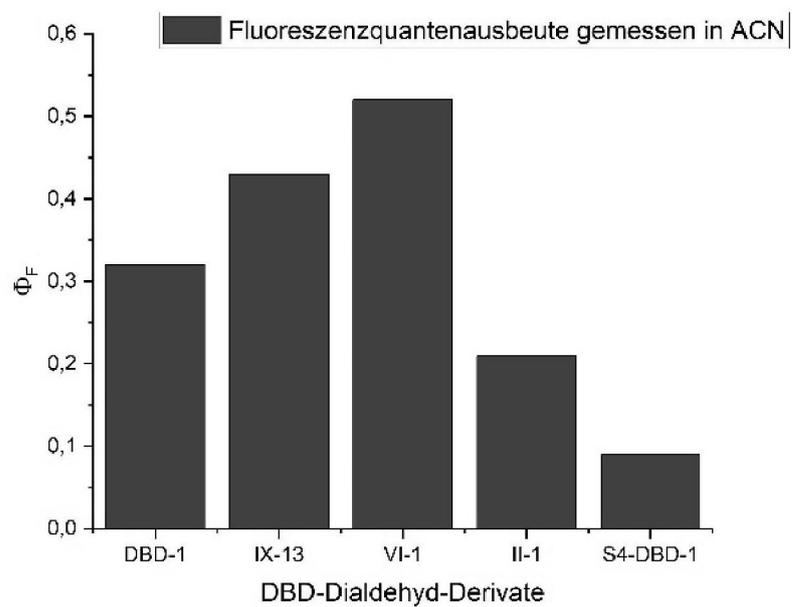


Fig. 4

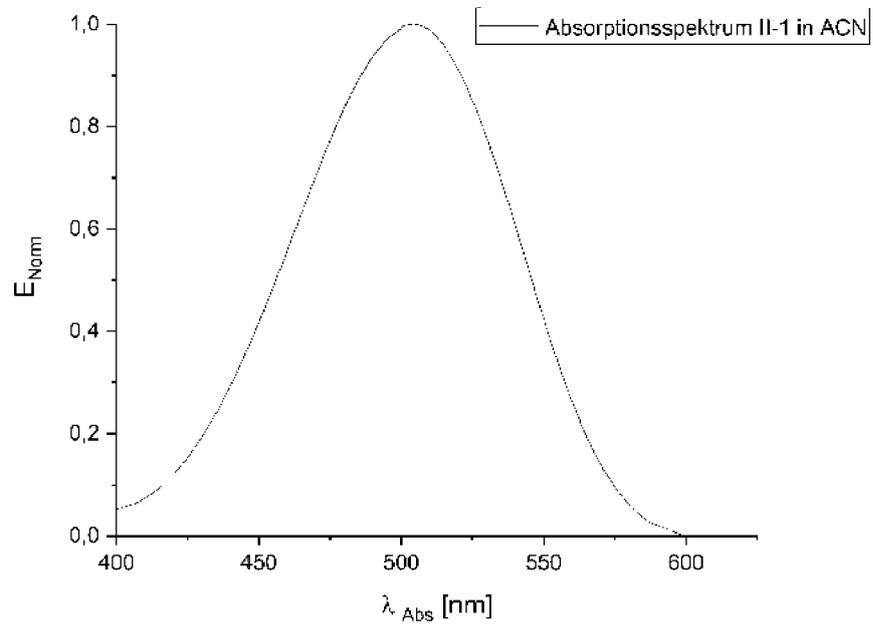


Fig. 5A

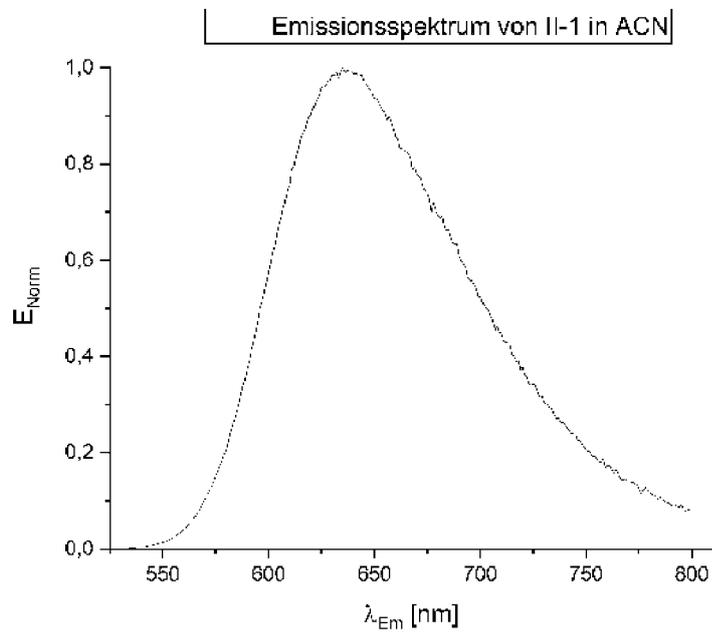


Fig. 5B

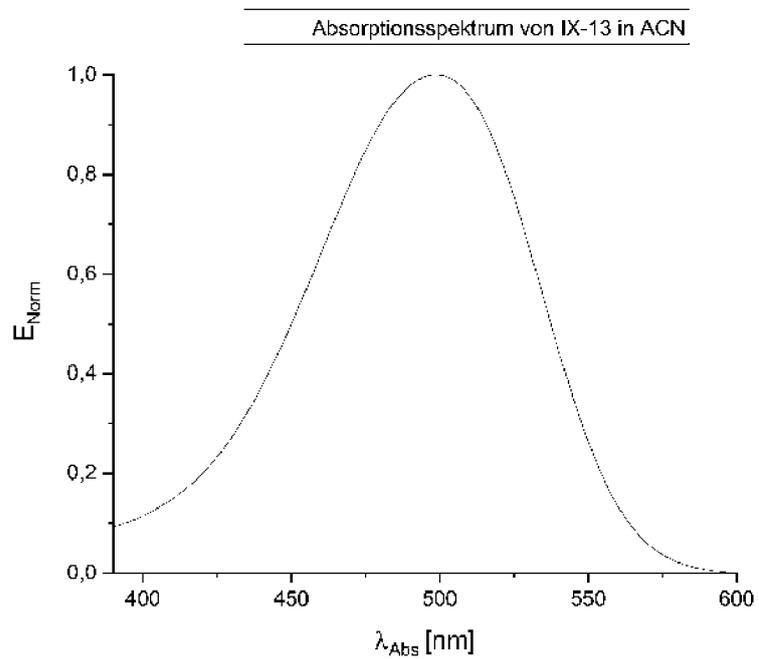


Fig. 6A

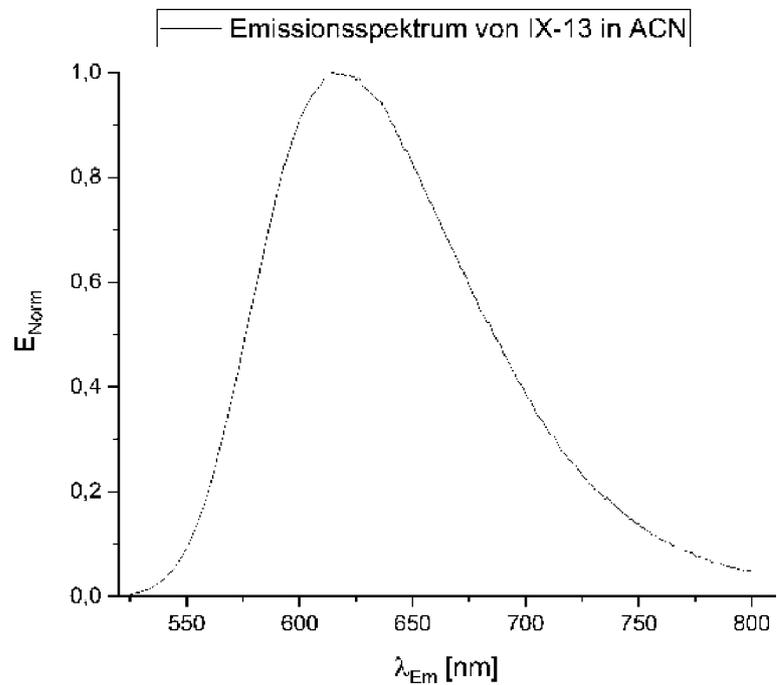


Fig. 6B

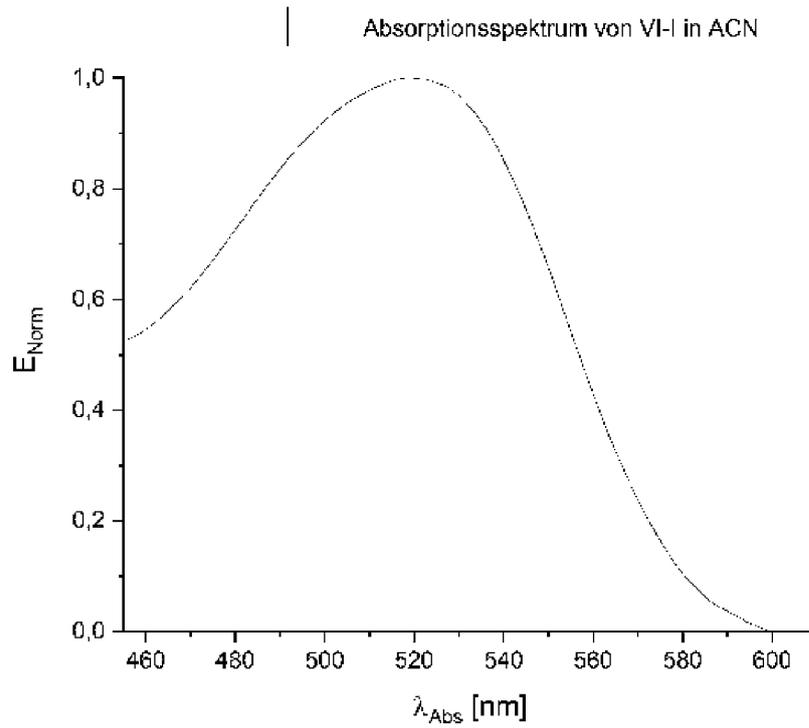


Fig. 7A

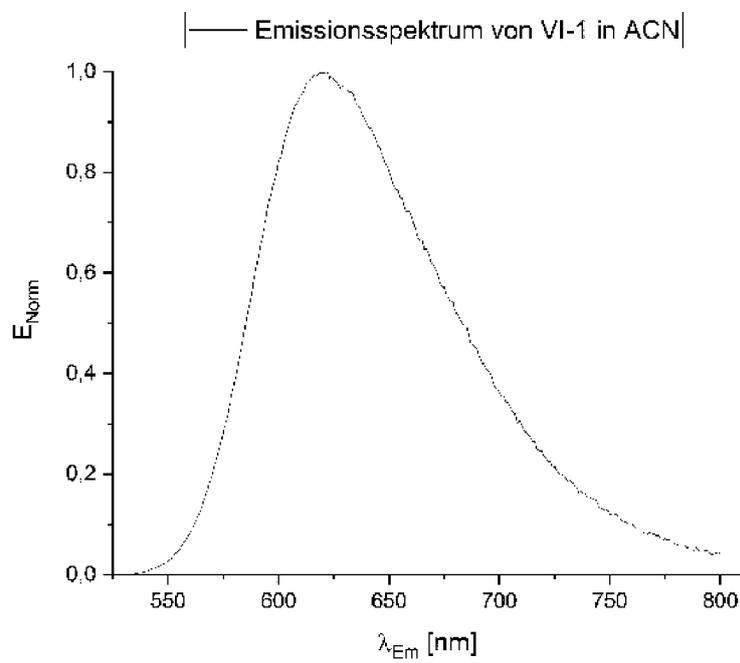


Fig. 7B