

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 638**

51 Int. Cl.:

C09B 23/14 (2006.01)

C09B 57/10 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2010 E 10173018 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2302002**

54 Título: **Colorantes de difluoroboroadiaceno**

30 Prioridad:

28.08.2009 DE 102009028982

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.07.2013

73 Titular/es:

**BAM BUNDESANSTALT FÜR
MATERIALFORSCHUNG UND-PRÜFUNG (100.0%)
Unter den Eichen 87
12205 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**DESCALZO, ANA, B., DR.;
FISCHER, TOBIAS;
BEHNKE, THOMAS y
RURACK, KNUT, DR.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 414 638 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Colorantes de difluoroboroadiazaindaceno

Antecedentes tecnológicos y estado de la técnica

5 Los colorantes fotoestables, que presentan una absorción digna de mención a muy considerable en todo el campo del espectro visible, presentan un rendimiento cuántico fluorescente de moderado a elevado y un gran desplazamiento de Stokes en la zona del espectro infrarrojo cercano (NIR), son débilmente solvatocromos o se encuentran descargados netamente (es decir, son neutros o de ión dipolar), representan materiales de marcaje o de referencia adecuados en aplicaciones químicas, físicas o biológicas, que se basan en la medida de señales de fluorescencia.

Colorantes NIR que se pueden adquirir a día de hoy se caracterizan por

- 10 (i) bandas de absorción estrechas y pronunciadas en el NIR, quedando excluida una excitación y uso en la zona visible, con bandas de fluorescencia estrechas y pequeños desplazamientos de Stokes, rendimientos cuánticos de fluorescencia de bajos a moderados y baja fotoestabilidad (por ejemplo, colorantes de cianina)
- 15 (ii) por bandas de absorción anchas pero pequeños desplazamientos de Stokes y bandas de fluorescencia estrechas con bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, que dan lugar a señales débiles (por ejemplo, porfirina),
- (iii) por bandas de fluorescencia con amplio desplazamiento de absorción y fuerte desplazamiento de Stokes pero solo bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia y una gran solvatocromía, es decir, una gran sensibilidad frente a cambios en su entorno inmediato (por ejemplo, colorantes de estirilo u oxazina),
- 20 (iv) por bandas de absorción estrechas y pronunciadas en el NIR, quedando excluida una excitación y uso en la zona visible, con bandas de fluorescencia estrechas y pequeños desplazamiento de Stokes, pero con altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y mayor fotoestabilidad (por ejemplo, colorantes de terrilenimida),
- (v) por buena fotoestabilidad y bandas de absorción y emisión anchas pero pequeños rendimientos cuánticos de fluorescencia (por ejemplo, colorantes de quaterrileno-bis(dicarboximida) o
- 25 (vi) por bandas de absorción estrechas y pronunciadas en el NIR, quedando excluida una excitación y uso en la zona visible, con bajos desplazamientos de Stokes y una sensibilidad frente a especies nucleófilas (por ejemplo, colorantes de escuraina),

Además la mayor parte de los colorantes NIR que se pueden adquirir hoy en día, con excepción de porfirina, escuarina y derivados de perileno, portan una carga neta (en la mayoría de los casos una positiva), lo que limita su aplicación en disolventes, materiales y entornos polares.

30 De esto resultan las siguientes desventajas:

- (i) bandas de absorción estrechas = ninguna posibilidad de excitación y uso en banda ancha,
- (ii) bajo desplazamiento de Stokes = posible separación insuficiente de la luz de excitación/dispersión y señal de fluorescencia,
- (iii) bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia = débiles señales de fluorescencia,
- 35 (iv) baja fotoestabilidad = tiempo de vida insuficiente del colorante o componente, y
- (v) solvatocromía pronunciada = fluctuaciones de señal no deseadas con cambios de los parámetros del entorno.

40 Es objetivo de la invención proporcionar colorantes que emitan en NIR electrónicamente neutros con mejores propiedades, es decir, posibilidad de excitación en banda ancha, fluorescencia NIR intensiva, mayor desplazamiento de Stokes, mayor fotoestabilidad, menor solvatocromía y una insensibilidad frente a influencias del entorno como fluoróforos potentes, marcadores o materiales de referencia para aplicaciones fluorométricas en NIR de lo más diversas.

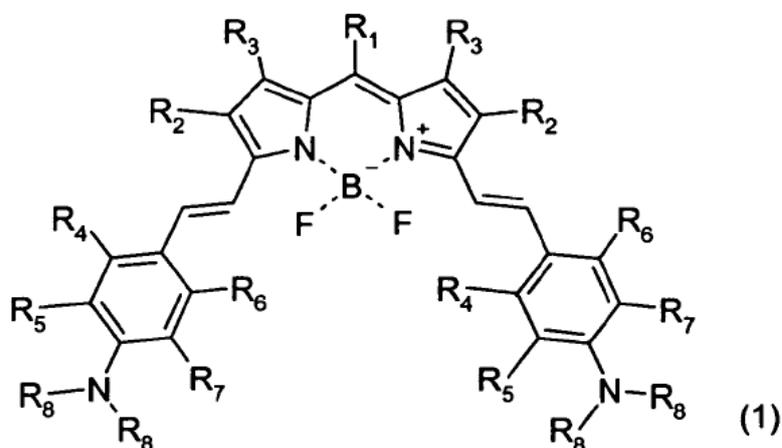
45 A este respecto la clase de complejos de difluoroborilo de dipirrina (también 4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno) presenta especial relevancia debido a la fluorescencia visual de esta clase de compuestos. Se comercializan representantes de esta clase de compuestos con los nombres comerciales BODIPY (en inglés BOron DIPYrrin) como marcadores de fluorescencia para aplicaciones de biología molecular. Además de su uso original como biomarcador el colorante es de uso también como sensor de cationes, colorante láser y en otros campos de la ciencia de materiales. Los

5 colorantes son sintéticamente relativamente simples con modelos de sustitución variables y se pueden obtener en cantidades preparativas. La causa de la amplitud de uso variada y sobre todo exitosa de esta clase de colorantes permite recuperar algunas propiedades fundamentales, como alto coeficiente de extinción molar ($\epsilon > 80.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), alto rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi > 0,70$) y moderado potencial redox. Representantes de esta clase de colorantes pueden obtenerse, por ejemplo, según los documentos US 5.248.782; US 6.005.113; E. Deniz y col., Organic Letters (2008), Vol. 10, nº 16, páginas 3401 - 3403; S. Erten-Ela y col., Organic Letters (2008), vol. 10, nº 15, páginas 3299 - 3302; O. Zheng y col., Chem. Eur. J. (2008), nº 14, páginas 5812 - 5819; y Ziessel y col., Chem. Eur. J. (2009), nº 15, páginas 1359 - 1369.

10 Como desventaja se pone de manifiesto que el colorante BODIBY está limitado de manera clásica al uso en el ámbito de longitudes de onda de 470 a 530 nm. Adicionalmente un desplazamiento de Stokes de 5 a 15 nm es para muchas aplicaciones un factor limitante. De forma particular para la aplicación en la espectroscopía de molécula individual y en aplicaciones multiplex esta propiedad es una desventaja drástica.

Resumen de la invención

15 Con la invención se deben resolver uno o varios de los problemas citados o al menos minimizarse. A tal fin la invención proporciona los siguientes colorantes de difluoroborodiazaindaceno de fórmula (I):



con

R_1 = resto fenilo sustituido con flúor $C_6H_mF_n$ con $n = 1$ a 5 y $m+n = 5$; o resto naftilo sustituido con flúor $C_{10}H_mF_n$ con $n = 1$ a 9 y $m+n = 9$;

20 $R_2 = CH_3, C_2H_5, C_3H_7$ o C_4H_9 ;

R_3 = alquilo, arilo o vinilarilo;

$R_4, R_5 = H, F$ o un resto $CH=CH-CH=CH$ que puentea R_4 y R_5 ;

$R_6, R_7 = H, F$ o un resto $CH=CH-CH=CH$ que puentea R_6 y R_7 ; y

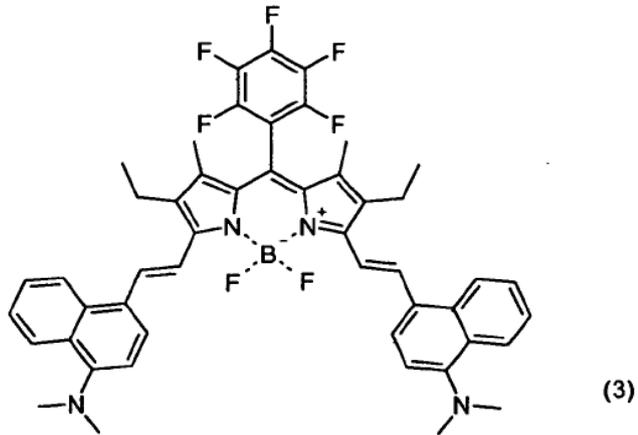
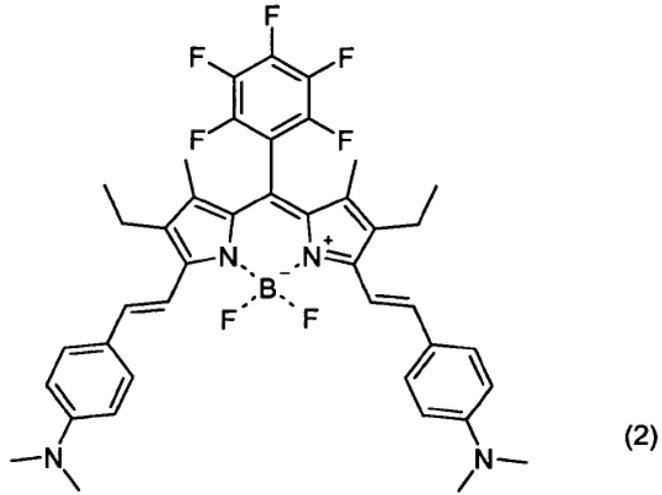
R_8 = alquilo o arilo.

25 Preferiblemente R_1 representa C_6F_5 .

Adicionalmente se prefiere, si R_3 representa CH_3 , de forma particular también en combinación con las formas de realización preferidas previamente descritas.

Además se prefiere, si R_4 y R_5 es un resto $CH=CH-CH=CH$ que puentea, de forma particular también en combinación con las formas de realización preferidas descritas previamente.

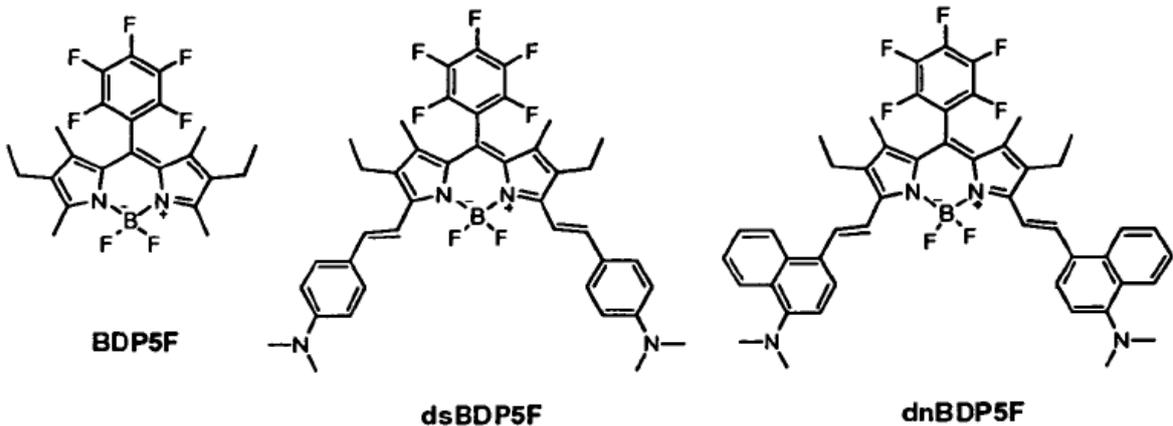
30 Son especialmente preferidos colorantes de difluoroborodiazaindaceno de fórmulas (2) y (3):



Los colorantes se pueden usar por lo general en ambientes y medios no polares, medianamente polares o muy polares ya sea disueltos o en forma molecular o encapsulada en partículas u otros materiales.

Descripción detallada de la invención

- 5 La invención se aclara más detalladamente a continuación con ayuda de dos ejemplos de realización **dnBDP5F** (que corresponde a la fórmula (3)) y **dsBDP5F** (que corresponde a la fórmula (2)) y precursores correspondientes de BDP5F (véase el esquema 1).



Esquema 1

Las figuras 1A y 1B muestran espectros de absorción y de fluorescencia de los colorantes **dnBDP5F** y **dsBDP5F** en dietiléter.

Parte experimental

- 5 Todos los reactivos provienen de fabricantes comerciales y se usaron sin más purificación, en tanto no se indique otra cosa. Todas las reacciones sensibles al aire y a la humedad se llevaron a cabo en atmósfera de argón en equipos de vidrio secos. El diclorometano se destiló en hidruro de calcio y la trietilamina se purificó mediante destilación. Los espectros de RMN se midieron con equipos de Bruker a 400 y 600 MHz.

Preparación de precursores de BDP5F

- 10 Se disolvieron 3-etil-2,4-dimetilpirrol (369,6 mg, 3 mmol) y 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehído (353,0 mg, 1,8 mmol) en CH_2Cl_2 seco (70 ml) en atmósfera de argón. Se añadió una gota de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitó la solución en la oscuridad durante 5 h a temperatura ambiente. Se añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DBQ, 408,6 mg, 1,8 mmol) y se agitó la mezcla durante otros 30 minutos. Se añadió luego trietilamina (4 ml) y etileterato de trifluoruro de boro (4 ml) a la mezcla de reacción. Después de otros 30 minutos de agitación se lavó la solución roja oscura con agua (3 x 50 ml) y diclorometano (50 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (CH_2Cl_2 /hexano al 50% en v/v) y se recristalizó en hexano. Se obtuvieron cristales rojos anaranjados (166 mg; 20% de rendimiento).

RMN: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) [ppm] δ = 2,55 (s, 6H, CH_3), 2,34 (c, J = 7,6 Hz, 4H, CH_2), 1,51 (s, 6H, CH_3), 1,02 (t, J = 7,6 Hz, 6H, CH_3).

- 20 **Preparación de dnBDP5F y dsBDP5F:**

En general se calentaron el aldehído correspondiente y **BDP5F** a reflujo durante 26 h en una mezcla de disolventes de tolueno seco (5 ml), ácido acético (0,15 ml) y piperidina (0,18 ml) con una pequeña adición de tamiz molecular de 4 Å. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente se retiró el disolvente a vacío y se eluyó el producto bruto por una columna de sílice con CH_2Cl_2 /hexano al 50% en v/v.

- 25 **dsBDP5F:** 19,2 mg (0,13 mmol) de 4-dimetilaminabenzaldehído y 30 mg (0,06 mmol) de **BDP5F** proporcionaron **dsBDP5F** como un polvo pardo. Rendimiento 2%.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) [ppm] δ = 7,63 (d, J = 16,7 Hz, 2H, CH), 7,54 (d, J = 8,9 Hz, 4H, CH), 7,23 (d, J = 16,7 Hz, 2H, CH), 6,74 (d, J = 8,9 Hz, 4H, CH), 3,03 (s, 12H, CH_3), 2,64 (c, J = 7,6 Hz, 4H, CH_2), 1,57 (s, 6H, CH_3), 1,19 (t, J = 7,6 Hz, 6H, CH_3).

- 30 **dnBDP5F:** 37,3 mg (0,187 mmol) de 4-(dimetilamin)-1-naftaldehído y 38,3 mg (0,08 mmol) de **BDP5F** proporcionaron **dnBDP5F** como colorante verde. Rendimiento 1%.

- 35 RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) [ppm] δ = 8,26 (m, 2H, CH), 8,17 (m, 2H, CH), 8,15 (d, J = 16,9 Hz, 2H, CH), 7,96 (d, J = 7,9 Hz, 2H, CH), 7,80 (d, J = 16,4 Hz, 2H, CH), 7,52 (m, 4H, CH), 7,16 (d, J = 7,9 Hz, 2H, CH), 2,95 (s, 12H, CH_3), 2,75 (c, J = 7,5 Hz, 4H, CH_2), 1,65 (s, 6H, CH_3), 1,31 (t, J = 7,5 Hz, 6H, CH_3).

Estudios de fotoestabilidad

- 40 Se realizaron estudios de fotoestabilidad con ayuda de una lámpara de Xenon de 150 W, con la que se irradió una cubeta de 1 mm a 670 mm con una anchura de rendija de 15 nm. El rayo de luz se focalizó sobre una superficie de $1,5 \text{ cm}^2$ de tamaño de la cubeta. Se registró la transmisión mediante un filtro de 600 nm. Se usaron como muestras 300 μl de solución de colorante con una concentración de $1,8 \times 10^{-5} \text{ mmol l}^{-1}$ (**dnBDP5F**) y $3,5 \times 10^{-5} \text{ mmol l}^{-1}$ (**dsBDP5F**) en THF, que correspondía a densidades ópticas de 0,08 o de 0,05. La irradiación se limitó a 17 h con una intensidad de irradiación promedio de $0,5 \text{ mW cm}^{-2}$. La energía de irradiación se midió con un diodo de Si calibrado para determinar la cantidad de fotones transmitidos y absorbidos. En base a las medidas se calculó la caída de la concentración según la ley de Lambert-Beer.

- 45 Se resumen en la tabla 1 y en las figuras 1A y 1B espectros representativos y datos espectroscópicos de **dsBDP5F** y **dnBDP5F**.

Datos espectroscópicos de **dsBDP5F** en distintos disolventes a 298 K, de una concentración de colorante de $2 \times$

10^{-6} M y con excitación a $\lambda_{\text{ex}} = 670$ nm (n.s. = no suficientemente soluble):

Tabla 1

Disolvente	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Delta\nu_{\text{abs-em}}/\text{cm}^{-1}$	Φ_f
Hexano	n.s.	n.s.	-	-
Dibutiléter	723	763	750	0,43
Dibutiléter	723	772	890	0,18
THF	739	792	900	0,11

5 Datos espectroscópicos de **dnBDP5F** en distintos disolventes a 298 K, de una concentración de colorante de 2×10^{-6} M y con excitación a $\lambda_{\text{ex}} = 640$ nm:

Tabla 2

Disolvente	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Delta\nu_{\text{abs-em}}/\text{cm}^{-1}$	Φ_f
Hexano	692	742	980	0,23
Dibutiléter	697	766	1290	0,17
Dibutiléter	696	779	1530	0,13
THF	699	827	2210	0,06

10 Se obtuvieron para **dsBDP5F** y **dnBDP5F** coeficientes de absorción molar y datos de fotoestabilidad representativos en THF. La notable fotoestabilidad de los colorantes se evidencia de forma particular con la caída de solo 1% para **dsBDP5F** y de 2% para **dnBDP5F** de la absorción de colorante después de 17 h de irradiación. Se supone que el efecto se debe entre otras causas al uso del resto pentafluorofenilo en posición meso. La tabla 3 compara los datos espectroscópicos de **BDP5F** y su análogo de fenilo, 1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-8-fenil-4-difluorobora-3a,4a-diaza-(s)-indaceno (**BDP5H**) en disolventes seleccionados a 298 K, a una concentración de 2×10^{-6} M y con excitación a $\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm:

15

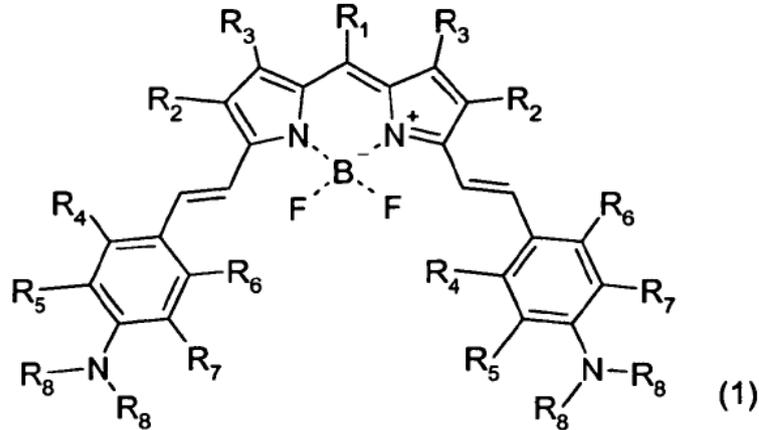
Tabla 3

	Disolvente	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Delta\nu_{\text{abs-em}}/\text{cm}^{-1}$	Φ_f
BDP5F	Dibutiléter	543	557	460	0,95
	Dietiléter	541	557	530	1,00
BDP5H	Dibutiléter	524	535	390	0,78
	Dietiléter	522	535	460	0,77

20

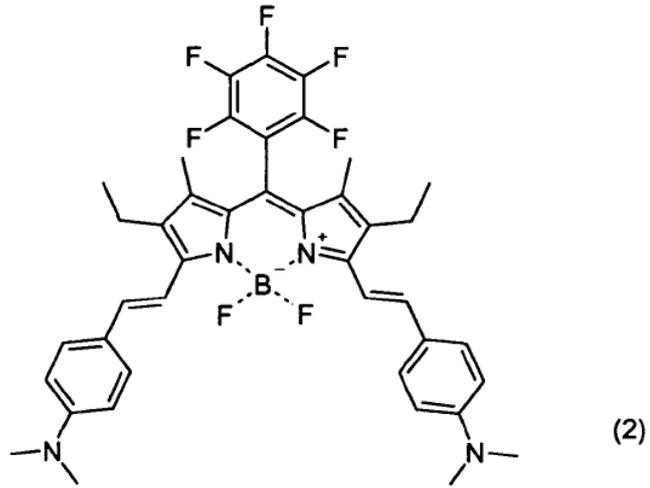
REIVINDICACIONES

1. Colorante de difluoroboroadiazaindaceno de fórmula (1)

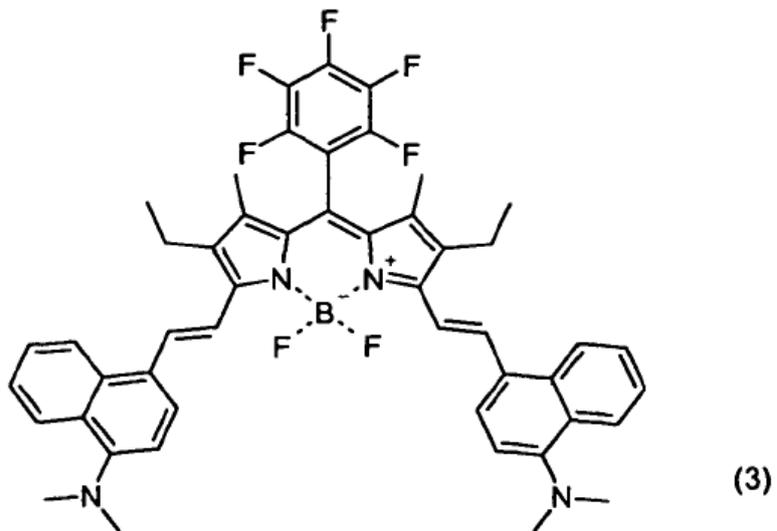


con

- 5 R_1 = resto fenilo sustituido con flúor $C_6H_mF_n$ con $n = 1$ a 5 y $m+n = 5$; o resto naftilo sustituido con flúor $C_{10}H_mF_n$ con $n = 1$ a 9 y $m+n = 9$;
- R_2 = CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 o C_4H_9 ;
- R_3 = alquilo, arilo o vinilarilo;
- R_4 , R_5 = H, F o un resto $CH=CH-CH=CH$ que puentea R_4 y R_5 ;
- 10 R_6 , R_7 = H, F o un resto $CH=CH-CH=CH$ que puentea R_6 y R_7 ; y
- R_8 = alquilo o arilo.
2. Colorante de difluoroboroadiazaindaceno según la reivindicación 1, en el que R_1 representa C_6F_5 .
3. Colorante de difluoroboroadiazaindaceno según una de las reivindicaciones precedentes, en el que R_3 representa CH_3 .
- 15 4. Colorante de difluoroboroadiazaindaceno según una de las reivindicaciones precedentes, en el que R_4 y R_5 representa un resto $CH=CH-CH=CH$ que puentea.
5. Colorante de difluoroboroadiazaindaceno de fórmula (2)



6. Colorante de difluoroborodiazaindaceno de fórmula (3)



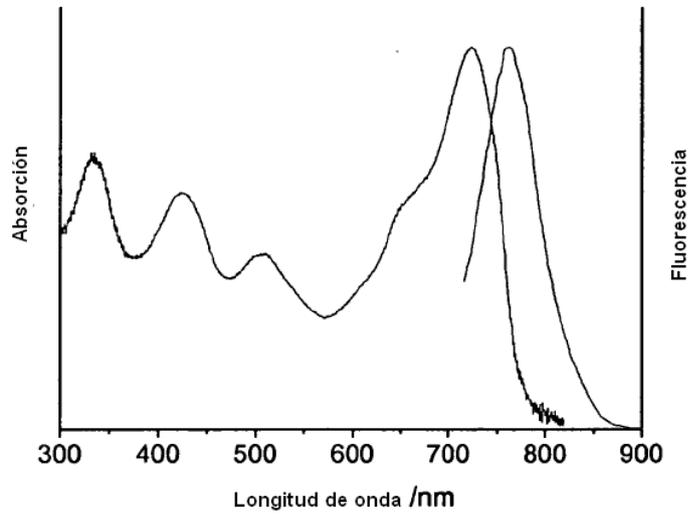


Fig. 1A

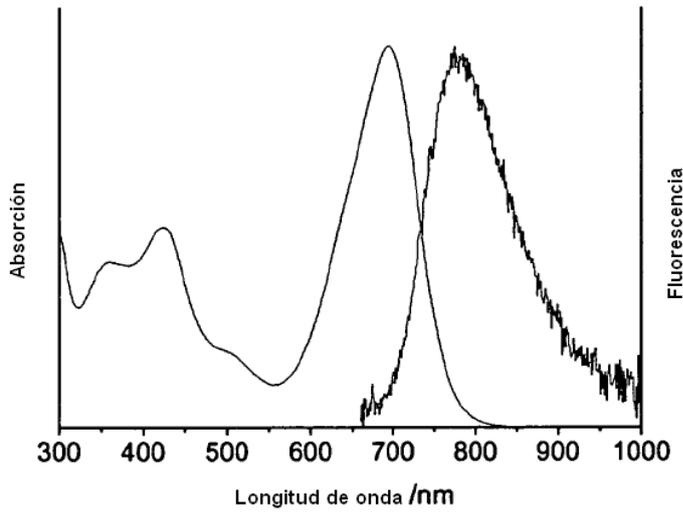


Fig. 1B