



(10) **DE 696 35 193 T3** 2011.03.10

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 977 035 B2**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 193.5**  
(86) Europäisches Aktenzeichen: **99 113 781.1**  
(96) Europäischer Anmeldetag: **06.06.1996**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2000**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **14.09.2005**  
(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **21.07.2010**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.03.2011**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/52** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C07D 239/60** (2006.01)  
**C07D 311/16** (2006.01)  
**C07D 209/08** (2006.01)  
**C07F 5/00** (2006.01)  
**C07F 5/02** (2006.01)

**Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert**

(30) Unionspriorität:  
**481977**                      **07.06.1995**      **US**

(73) Patentinhaber:  
**The Regents of the University of California,  
Oakland, Calif., US**

(74) Vertreter:  
**Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman  
Vossius, Dr. Georg Schnappauf, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsanstalten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**Tsien, Roger Y., La Jolla, CA 92037, US; Gonzalez,  
Jesus E., La Jolla, CA 92037, US**

(54) Bezeichnung: **System zur Messung des elektrischen Potentials durch eine Membrane**

### Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft im allgemeinen den Nachweis und die Messung von Transmembran-Potentialen. Insbesondere betrifft die Erfindung Zusammensetzungen und optische Verfahren zur Bestimmung von Transmembran-Potentialen biologischer Zellen.

**[0002]** Fluoreszenznachweis und Abbilden von zellulärer elektrischer Aktivität ist eine sehr wichtige Technik mit Potential (A. Grinvald, R. D. Frostig, E. Lieke, R. Hildesheim, 1988, Optical imaging of neuronal activity, *Physiol. Rev.* 68, 1285–1366; B. M. Salzberg, 1983, Optical recording of electrical activity in neurons using molecular probes, in: *Current Methods in Cellular Neurobiology*, J. L. Barker, Hrsg., Wiley, New York, 139–187; L. B. Cohen, S. Leshner, 1985, Optical monitoring of membrane potential: methods of multisite optical measurement, in: *Optical Methods in Cell Physiology*, P. de Weer, B. M. Salzberg, Hrsg., Wiley, New York, 71–99).

**[0003]** Die Mechanismen für das optische Abtasten eines Membranpotentials wurden traditionell in zwei Klassen eingeteilt:

- 1.) empfindliche, aber langsame Umverteilung von permeablen Ionen vom extrazellulären Medium in die Zelle, und
- 2.) schnelle, aber geringfügige Störungen von relativ impermeablen Farbstoffen, die auf einer Fläche der Plasmamembran gebunden sind; vgl. L. M. Loew, "How to choose a potentiometric membrane probe", in: *Spectroscopic Membrane Probes*, L. M. Loew, Hrsg., 139–151 (1988) (CRC Press, Boca Raton); L. M. Loew, "Potentiometric membrane dyes", in: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, W. T. Mason, Hrsg., 150–160 (1993) (Academic Press, San Diego).

**[0004]** Die permeablen Ionen sind empfindlich, da das Verhältnis ihrer Konzentrationen zwischen der Innen- und Außenseite der Zelle sich bis zur Nernstschen Grenze von 10fach für eine Veränderung des Transmembran-Potentials von 60 mV ändern kann. Ihre Antworten darauf sind jedoch langsam, da zur Einstellung neuer Gleichgewichte Ionen durch unbewegte Schichten in jeder wässrigen Phase und dem Inneren der Plasmamembran, das eine niedrige Dielektrizitätskonstante aufweist, diffundieren müssen. Darüber hinaus verteilen sich solche Farbstoffe ungerichtet in alle verfügbaren hydrophoben Bindungsstellen. Daher ist eine Selektivität zwischen Zelltypen schwierig. Auch jegliche Zugaben von hydrophoben Proteinen oder Reagenzien zur externen Lösung oder Veränderungen beim Aussetzen gegenüber hydrophoben Oberflächen können Artefakte verursachen. Diese Indikatoren können auch keine Verschiebung von Fluoreszenz-Wellenlängen oder ratiometrischen Ergebnissen liefern. Solche Doppel-Wellenlängen-Darstellungen sind zur Vermeidung von Artefakten geeignet, die auf Veränderungen in der Farbstoffkonzentration, der Weglänge, der Zellzahl, der Quellenintensität und der Nachweiseffizienz zurückzuführen sind.

**[0005]** Im Gegensatz dazu können die impermeablen Farbstoffe sehr schnell antworten, da sie nur eine geringe oder keine örtliche Verschiebung erfordern. Die impermeablen Farbstoffe sind jedoch unempfindlich, da sie das elektrische Feld mit nur einem Teil einer Einheitsladung abfühlen, die sich nicht über die gesamte Länge des Moleküls bewegt, wobei die Länge wiederum nur einen kleinen Teil der Transmembran-Distanz darstellt. Darüber hinaus stammt ein signifikanter Anteil des gesamten Farbstoffsignals von Molekülen, die sich auf irrelevanten Membranen oder Zellen befinden, was zur Verwässerung des Signals von den wenigen richtig platzierten Molekülen führt.

Rink et al. in *Biochem. Biophys. Acta*, Bd. 595 (1980), Seiten 15–30, die Verwendung von Bis-(1,3-dietylthiobarbiturat)-trimethin-oxonol als Fluoreszenzsonde zur Messung von Membranpotentialen.

**[0006]** Die US-PS 4,560,665 beschreibt ein Verfahren zur Messung von Membranfusionen zwischen Liposomen, die aus Phospholipid hergestellt sind, wobei das Verfahren gekennzeichnet ist durch die Kombination von Ionophoren, fluoreszierenden Farbstoffen, die gegenüber dem Membranpotential (im Inneren negativ) empfindlich sind, und Porinen, die die membranbildenden Proteine sind. Mit diesem Verfahren kann das Ausmaß der Liposomfusion einfach und genau bestimmt werden.

**[0007]** Die US-PS 4,861,727 beschreibt einen Sauerstoff-Sensor zur Bestimmung des Partialdrucks von Sauerstoff. Der Sauerstoff-Sensor umfaßt Sauerstoff-quenchbare lumineszierende Lanthanidkomplexe, vorzugsweise Terbiumkomplexe von Schiffischen Basen oder  $\beta$ -Diketon-Liganden.

**[0008]** Gutiérrez-Merino et al. beschreiben in *Biochemistry*, Bd. 34 (1995), Seiten 4846–4855, eine Studie zur Verteilung der beiden fluoreszierenden Phospholipid-Analoga über die Acetylcholin-Rezeptor (AChR)-reichen Membranen von *Torpedo marmorata* durch eine Kombination von nicht-strahlendem Fluoreszenz-Resonanz-

energietransfer unter Verwendung von Lipidsonden und Quenching ihrer Fluoreszenz mit  $\text{Co}^{2+}$  und 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure. Das Membranpotential wurde unter anderem unter Verwendung von exofacialer RhoPE mit  $\text{Co}^{2+}$ -Quenching der Fluoreszenz gemessen.

**[0009]** Die EP-A-0 552 107 beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung des pH-Wertes oder von  $\text{pCO}_2$  mittels Lumineszenz-Lebensdauer und Energietransfer, wobei ein Energietransfer-Donor-Akzeptor-Paar einer zu analysierenden Probe ausgesetzt wird, wobei der Donor des Donor-Akzeptor-Paares photolumineszent ist und der Akzeptor des Donor-Akzeptor-Paares gegenüber dem pH-Wert oder dem  $\text{pCO}_2$  der Probe empfindlich ist. Eines oder beide Donor-Akzeptor-Paare können an einen Träger gebunden sein. Darüber hinaus kann der Donor und der Akzeptor mittels eines Spacers verbunden sein und sie liegen in einem bekannten Verhältnis vor.

**[0010]** Die WO 95/08637 betrifft einen nicht kompetitiven Immunoassay zum Nachweis des Vorliegens eines unbekanntes Analyten in Lösung. Der Immunoassay umfaßt a) einen Ionenkanalrezeptor, der in einem Lipidfilm, der in Kontakt mit einer Ionen-enthaltenden Lösung auf jeder Seite davon steht, immobilisiert ist; b) einen mit dem Rezeptor konjugierten Liganden, der eine besondere Affinität für den Analyten in Lösung aufweist und der beim Binden an den Analyten in Lösung eine Hemmung des Ionenflusses durch den Kanal verursacht; und c) eine Einrichtung zum Nachweis der Hemmung des Ionenflusses durch den Kanal als Antwort auf das Binden des konjugierten Liganden an den Analyten.

**[0011]** Die EP-A-0 397 641 betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines oder mehrerer chemischer Parameter eines Probemediums wie z. B. die Wasserstoffionen-Konzentration oder die  $\text{Ba}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -, usw. -Konzentration. Im Verfahren wird ein fluoreszierendes Mittel und ein nahe daran angrenzendes chromogenes Mittel eingesetzt.

**[0012]** Die EP-A-0 429 907 betrifft einen Sensor mit einem Aufbau für ein Nachweisverfahren für Moleküle, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, und zwar zum Nachweis dieser gelösten Substanzen durch Energietransfer mittels einer Fluoreszenztechnik.

**[0013]** Im Hinblick auf die vorstehend erwähnten Nachteile sind Verfahren und Zusammensetzungen erforderlich, die für kleine Veränderungen des Transmembran-Potentials empfindlich sind und sowohl auf schnelle, vorzugsweise im ms-Zeitmaßstab, als auch anhaltende Membranpotential-Veränderungen antworten können. Es besteht auch ein Bedarf für Verfahren und Zusammensetzungen, die gegenüber den Wirkungen von Veränderungen der externen Lösungszusammensetzungen weniger empfindlich sind, Membranen von speziellen Zelltypen besser selektiv kontrollieren und ein Fluoreszenz-Verhältnissignal bereitstellen können. Diese und vergleichbare Erfordernisse werden erfindungsgemäß erfüllt.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0014]** Es werden Verfahren und Zusammensetzungen zur Bestimmung von elektrischen Transmembran-Potentialen (Membranpotentialen), insbesondere der äußersten (Plasma-)Membran von lebenden Zellen bereitgestellt. In einem Aspekt umfaßt das Verfahren:

- (a) Einführen eines ersten Reagenz, umfassend ein hydrophobes fluoreszierendes Ion, das sich von einer ersten Membranfläche zu einer zweiten Membranfläche als Antwort auf Veränderungen des Membranpotentials umverteilen kann, entsprechend der Nernst-Gleichung;
- (b) Einführen eines zweiten Reagenz, das eine Fläche, üblicherweise die extrazelluläre Membranfläche markiert, wobei das zweite Reagenz einen Chromophor umfaßt, der einem Energietransfer unterliegen kann, entweder durch (i) Abgeben von Energie des angeregten Zustands an das fluoreszierende Ion oder (ii) Aufnehmen von Energie des angeregten Zustands vom fluoreszierenden Ion;
- (c) Aussetzen der Membran gegenüber Anregungslicht einer geeigneten Wellenlänge, typischerweise in der ultravioletten oder sichtbaren Region;
- (d) Messen des Energietransfers zwischen dem fluoreszierenden Ion und dem zweiten Reagenz; und
- (e) In-Beziehung-Setzen des Energietransfers zum Membranpotential.

**[0015]** Erfindungsgemäß können die ersten und zweiten Reagenzien nur dann durch einen Linker miteinander verbunden sein, wenn das zweite Reagenz ein grün fluoreszierendes Protein, ein fluoreszierend markiertes Protein oder ein Coumarin umfaßt. In allen anderen Ausführungsformen können die ersten und zweiten Reagenzien nicht durch eine Linkergruppe miteinander verbunden sein.

**[0016]** Das zweite Reagenz ist vorzugsweise ein Fluorophor. In jedem Fall kann die Wechselwirkung des angeregten Zustands über einen Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) ablaufen, der bevorzugt ist,

oder über einige weitere Mechanismen wie Elektronentransfer, Austausch-Wechselwirkung (Dexter), paramagnetisches Quenching oder beschleunigtes Intersystem Crossing. Das Verfahren ist besonders geeignet zum Nachweis von Veränderungen des Membranpotentials der Plasmamembran in biologischen Zellen.

**[0017]** Vorzugsweise ist das hydrophobe Ion ein Anion, das die extrazelluläre Oberfläche der Plasmamembran markiert. Nach Zugabe des hydrophoben fluoreszierenden Anions zur Membran, Zelle oder Gewebepräparation bewegt sich das Anion in die Plasmamembran, wo es sich zwischen den extrazellulären und intrazellulären Oberflächen gemäß einem Nernstschen Gleichgewicht verteilt. Veränderungen des Membranpotentials lassen das fluoreszierende Anion durch die Membran wandern, so daß es an eine positiv geladene Oberfläche (die intrazelluläre oder extrazelluläre Oberfläche) bindet, je nach dem, welche der beiden Oberflächen positiv geladen ist. Da die Effizienz des Energietransfers zwischen den beiden Reagenzien eine Funktion des Abstands zwischen ihnen ist und da dieser Abstand sich verändert, wenn das fluoreszierende Anion sich durch die Membran hin und zurück umverteilt, stellt die Messung des Energietransfers ein empfindliches Maß für Veränderungen des Transmembran-Potentials dar. Wenn sich beispielsweise das Membranpotential (intrazellulär im Verhältnis zu extrazellulär) von negativ zu positiv ändert, wird das fluoreszierende hydrophobe Anion von der extrazellulären Oberfläche zur intrazellulären Oberfläche der Plasmamembran gezogen. Wenn sich das zweite Reagenz auf der extrazellulären Oberfläche befindet, führt dies zu einer Vergrößerung des Abstands zwischen dem Anion und dem zweiten Reagenz und einem damit verbundenen Rückgang in der Effizienz des FRET und zu einem Quenching zwischen den beiden Spezies. Folglich führen Fluoreszenzmessungen bei geeigneten Anregungs- und Emissionswellenlängen zu einem Fluoreszenzmeßergebnis, das gegenüber den Veränderungen des Transmembran-Potentials empfindlich ist. Typischerweise ist die Zeitkonstante für die Umverteilung des fluoreszierenden Anions schnell und liegt im ms-Bereich. Das läßt eine bequeme Messung sowohl eines schnellen zellulären elektrischen Phänomens zu, wie eines Aktionspotentials oder einer Ligand-induzierten Kanalöffnung sowie von langsameren und länger andauernden Veränderungen, die durch Veränderung der Aktivität von Ionenpumpen oder -austauschern induziert werden.

**[0018]** Herkömmliche elektrophysiologische Techniken nehmen das Potential an der Spitze einer Elektrode ab und sind folglich auf Messungen einer einzelnen Zelle beschränkt. Im Gegensatz dazu sind die hier beschriebenen optischen Indikatoren besonders vorteilhaft zur gleichzeitigen Kontrolle des Membranpotentials vieler Neuronen oder Muskelzellen. Optische Indikatoren erfordern anders als herkömmliche Mikroelektroden keine physikalische Punction der Membran; in vielen Zellen oder Organellen führt eine solche Punction zu starken Zerstörungen oder ist mechanisch schwierig durchzuführen. Optische Indikatoren sind somit für Zellen geeignet, die zu klein oder zu empfindlich sind, um von Elektroden durchbohrt zu werden.

**[0019]** In einem anderen Aspekt der Erfindung lassen die Spannungsabfühlverfahren einen Nachweis der Wirkung von Testproben, wie potentiellen therapeutischen Arzneimittel-Molekülen, auf die Aktivierung/Deaktivierung von Ionen-Transporteinrichtungen (Kanälen, Pumpen oder Austauschern) zu, die in der Membran eingebettet sind.

**[0020]** Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen umfassen zwei Reagenzien. Das erste Reagenz umfaßt ein hydrophobes fluoreszierendes Ion (vorzugsweise ein Anion), das sich von einer Membranoberfläche zur anderen als Antwort auf Veränderungen des Transmembran-Potentials umverteilen kann. Dieses Anion wird als mobiles oder hydrophobes Anion bezeichnet. Beispiele dafür sind Polymethinoxonole, Tetraarylborate, die mit Fluorophoren konjugiert sind, und fluoreszierende Komplexe von Seltenerd- und Übergangsmetallen. Das zweite Reagenz umfaßt einen Chromophor, vorzugsweise ein Fluorophor, der einem Energietransfer unterliegen kann, entweder durch (i) Abgeben von Energie des angeregten Zustands an das fluoreszierende Anion oder (ii) Aufnehmen von Energie des angeregten Zustands vom fluoreszierenden Anion. Das zweite Reagenz bindet selektiv an eine Oberfläche der Membran und im Gegensatz zum ersten Reagenz findet keine Umverteilung als Antwort auf Veränderungen des Membranpotentials statt. Es wird daher als das asymmetrisch gebundene oder nicht-mobile Reagenz bezeichnet. Beispiele für zweite Reagenzien sind fluoreszierende Lektine, fluoreszierende Lipide, fluoreszierende Kohlenhydrate, fluoreszierend-markierte Antikörper gegen Oberflächenmembranbestandteile und amphiphile fluoreszierende Farbstoffe. In der erfindungsgemäßen Ausführungsform, in der eine Linkergruppe vorliegen kann, ist die Linkergruppe ausreichend lang, so daß das erste Reagenz auf der dem zweiten Reagenz gegenüberliegenden Oberfläche der Membran verbleiben und somit den FRET verringern kann.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0021]** Die Erfindung wird näher durch die begleitenden Zeichnungen erläutert, wobei:

- [0022] [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) ein Schema des spannungsempfindlichen FRET-Mechanismus veranschaulichen;
- [0023] [Fig. 2](#) normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren von (A) Fluorescein-markiertem Weizenkeim-Agglutinin (FL-WGA) in Hanks ausgewogener Salzlösung (HBSS), (B) (1,3-Dihexyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonol [DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)] in Octanol und (C) TR-WGA in HBSS zeigt;
- [0024] [Fig. 3](#) Verschiebungsströme von 2,3 µM DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) in L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen bei 20°C zeigt;
- [0025] [Fig. 4](#) die Spannungsabhängigkeit von DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) zeigt, das während der Verschiebungs- und Flankenströme bei stufenweisen Spannungsveränderungen, ausgehend von einem -30 mV Haltepotential bewegt wurde;
- [0026] [Fig. 5](#) die Spannungsabhängigkeit von DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) Verschiebungsstrom-Zeitkonstanten in L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen für die gleichen Daten wie in [Fig. 4](#) zeigt;
- [0027] [Fig. 6](#) die gleichzeitigen Fluoreszenzveränderungen des FL-WGA/DiSBA-C<sub>4</sub>-(3)-Paares als Antwort auf vier Depolarisationen von -70 mV auf 40, 80, 120 und 160 mV in einer L-M(TK<sup>-</sup>)-Zelle bei 20°C zeigt, wobei die Einzelwellenlängen-Fluoreszenzemissionsspektren von DiSBA-C<sub>4</sub>-(3) und FL-WGA in A bzw. B und das FL-WGA/DiSBA-C<sub>4</sub>-(3)-Verhältnis in (C) zeigt;
- [0028] [Fig. 7](#) den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzänderung des FL-WGA/DiSBA-C<sub>10</sub>-(3)-Paares als Antwort auf eine 100 mV Depolarisation, ausgehend von 70 mV zeigt;
- [0029] [Fig. 8](#) eine Einzel-Sweep-Spur der Fluoreszenzverhältnisänderungen des FL-WGA/DiSBA-C<sub>4</sub>-(3)-Paares in schlagenden neonatalen Herzmyozyten zeigt, wobei die obere Spur (A) den FL-WGA-Kanal, (B) den langwelligeren Oxonolkanal und (C) das FL-WGA/Oxonol-Verhältnis zeigt, bei dem Bewegungsartefakte signifikant verringert sind;
- [0030] [Fig. 9](#) die Fluoreszenzänderungen des FL-WGA/DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)-Paares in einer spannungsabgegriffenen (voltage clamped) Astrozytomzellen zeigt, wobei die obere Spur (A) die DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)-Emission, (B) das FL-WGA-Fluoreszenzsignal und (C) das FL-WGA/Oxonol-Verhältnis zeigt;
- [0031] [Fig. 10](#) die Synthese eines fluoreszierenden Tetraarylborats zeigt;
- [0032] [Fig. 11](#) eine Synthese eines asymmetrischen Oxonols und dessen Bindung an ein zweites Reagenz;
- [0033] [Fig. 12](#) mögliche Bindungspunkte (X) von Oxonolen an ein zweites Reagenz zeigt;
- [0034] [Fig. 13](#) eine Synthese von DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) zeigt;
- [0035] [Fig. 14](#) die Synthese eines bifunktionellen Linkers zeigt;
- [0036] [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#) die Synthese eines asymmetrischen Oxonols mit einem Linker zeigen, der zur Bindung an ein zweites Reagenz geeignet ist;
- [0037] [Fig. 17](#) einen FRET zwischen Cou-PE, einem Konjugat eines 6-Chlor-7-hydroxycumarins mit Dimyristoylphosphatidylethanolamin als FRET-Donor, und einem Bis-(1,3-dihexyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonol in einer Astrozytomzelle zeigt;
- [0038] [Fig. 18](#) einen FRET zwischen DMPE-Glycin-Cumarin (Cou-PE) als FRET-Donor und einem Bis-(1,3-dihexyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonol in L-Zellen zeigt;
- [0039] [Fig. 19](#) einen FRET zwischen DMPE-Glycin-Cumarin (Cou-PE) als FRET-Donor und einem Bis-(1,3-dihexyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonol in Herzmyozyten zeigt, und zwar gemessen durch Ratio-Output;
- [0040] [Fig. 20](#) repräsentative fluoreszierende Phosphatidylethanolamin-Konjugate zeigt, die als FRET-Donoren gegenüber den Oxonolen wirken. Die Strukturen der linken Seite zeigen repräsentative Fluorophore und X bezeichnet die Bindungsstelle des Phosphatidylethanolamins (PE). Die Struktur (PE-R) auf der rechten Seite zeigt ein Phosphatidylethanolamin, wobei R ein Fluorophor bezeichnet, das an die Aminogruppe des Ethanolamins gebunden ist;

**[0041]** Fig. 21 das (A) Emissionsspektrum von Cou-PE, (B) das Anregungsspektrum von DiSBA-C<sub>6</sub>-(5) und (C) das Emissionsspektrum von DiSBA-C<sub>6</sub>-(5) zeigt;

**[0042]** Fig. 22 die Geschwindigkeit der DiSBA-C<sub>6</sub>-(5)-Translokation als Antwort auf eine 100 mV Depolarisationsstufe zeigt, und zwar unter Verwendung des FRET eines asymmetrisch markierten Cou-PE; und

**[0043]** Fig. 23 die Spektren von [TB(Salen)<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> (oben) und [Eu(Salen)<sub>2</sub>]<sup>-1</sup> (unten) zeigt, wobei beide als Piperidiniumsalze, gelöst in Acetonitril, vorliegen.

#### BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORM

**[0044]** Die folgenden Definitionen sollen die Bedeutung und den Bereich der verschiedenen Begriffe veranschaulichen und definieren, die zur Beschreibung der Erfindung verwendet werden.

**[0045]** Der Begriff "Hydrocarbonyl" bezieht sich auf einen organischen Rest, der Kohlenstoffketten umfaßt, an die Wasserstoffatome und andere Elemente gebunden sind. Der Begriff beinhaltet Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl- und Arylgruppen, Gruppen, die aus einem Gemisch von gesättigten und ungesättigten Bindungen bestehen, carbocyclische Ringe sowie Kombinationen solcher Gruppen. Der Begriff kann sich auf geradkettige, verzweigt-kettige, cyclische Strukturen oder Kombinationen davon beziehen.

**[0046]** Der Begriff "Alkyl" bezieht sich auf einen verzweigt- oder geradkettigen acyclischen, einwertigen gesättigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen.

**[0047]** Der Begriff "Alkenyl" bezieht sich auf einen ungesättigten Kohlenwasserstoffrest, der mindestens eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung enthält, und beinhaltet geradkettige, verzweigt-kettige und cyclische Reste.

**[0048]** Der Begriff "Alkynyl" bezieht sich auf einen ungesättigten Kohlenwasserstoffrest, der mindestens eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindung enthält und beinhaltet geradkettige, verzweigt-kettige und cyclische Reste.

**[0049]** Der Begriff "Nieder", der hier in Verbindung mit organischen Resten bzw. Verbindungen verwendet wird, definiert Reste bzw. Verbindungen mit bis zu und einschließlich 6, vorzugsweise bis zu und einschließlich 4 Kohlenstoffatomen. Solche Reste können geradkettig oder verzweigt-kettig sein.

**[0050]** Der Begriff "Heteroalkyl" bezieht sich auf einen verzweigt- oder geradkettigen acyclischen, einwertigen gesättigten Rest mit 2 bis 40 Atomen in der Kette, wobei mindestens eines der Atome in der Kette ein Heteroatom wie z. B. Sauerstoff oder Schwefel ist.

**[0051]** Der Begriff "Niederalkyl" bezieht sich auf einen Alkylrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Beispiele für Niederalkylreste sind Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, Isopropyl-, Isobutyl-, sec-Butyl-, n-Butyl-, t-Butyl-, n-Hexyl- und 3-Methylpentylgruppen.

**[0052]** Der Begriff "Cycloalkyl" bezieht sich auf einen einwertigen gesättigten carbocyclischen Rest mit 3 bis 12 Kohlenstoffatomen im Carbocyclus.

**[0053]** Der Begriff "Heterocycloalkyl" bezieht sich auf einen einwertigen gesättigten cyclischen Rest mit 1 bis 12 Atomen im Ring, wobei der Ring mindestens ein Heteroatom (wie Sauerstoff oder Schwefel) enthält.

**[0054]** Der Begriff "Alkylen" bezieht sich auf einen vollständig gesättigten, cyclischen oder acyclischen, zweiwertigen, verzweigt- oder geradkettigen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 40 Kohlenstoffatomen. Beispiele für Alkylenreste sind Methylen-, Ethylen-, n-Propylen-, 1-Ethylethylen- und n-Heptylengruppen.

**[0055]** Der Begriff "Heteroalkylen" bezieht sich auf einen Alkylenrest, bei dem mindestens eines der Atome in der Kette ein Heteroatom ist.

**[0056]** Der Begriff "Heterocyclo-diyl" bezieht sich auf einen zweiwertigen Rest, der einen heterocyclischen Ring enthält. Die freien Valenzen können beide am heterocyclischen Ring vorliegen oder eine oder beide können sich auf den Alkylensubstituenten befinden, die am Ring gebunden sind.

**[0057]** Der Begriff "Niederalkylen" bezieht sich auf einen vollständig gesättigten, acyclischen, zweiwertigen, verzweigt- oder geradkettigen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen. Beispiele für Niederalkylenreste sind Methylen-, Ethylen-, n-Propylen-, Isopropylen-, n-Butylen-, Isobutylen-(oder 2-Methylpropylen)-, Isoamylen-(oder 3,3-Dimethylpropylen)-, Pentylen- und n-Hexylengruppen.

**[0058]** Der Begriff "Cycloalkyl-niederalkyl" bezieht sich auf eine Cycloalkylgruppe, die an einen Niederalkylrest gebunden ist. Beispiele für Cycloalkyl-niederalkylgruppen sind Cyclopropylmethyl-, Cyclopentylmethyl-, Cyclopentylethyl- und Cyclopentylpropylgruppen.

**[0059]** Der Begriff "substituiertes Phenyl" bezieht sich auf eine Phenylgruppe, die unabhängig mit Hydrocarbyl-, Alkyl-, Niederalkyl-, Cycloalkyl- oder Cycloalkyl-niederalkylgruppen mono-, di-, tri- oder tetrasubstituiert ist.

**[0060]** Der Begriff "Aryl" bezieht sich auf einen aromatischen einwertigen carbocyclischen Rest, der aus einem einzigen Ring (z. B. Phenyl) oder aus mehreren anellierten Ringen (z. B. Naphthyl, Anthracenyl) besteht, der gegebenenfalls unabhängig mit Hydrocarbyl-, Alkyl-, Niederalkyl-, Cycloalkyl- oder Cycloalkyl-niederalkylgruppen mono-, di- oder trisubstituiert sein kann.

**[0061]** Der Begriff "Arylen" bezieht sich auf einen aromatischen zweiwertigen carbocyclischen Rest. Die freien Valenzpositionen können jegliche Positionen auf dem/den Ring(en) sein. Im Fall eines zweiwertigen Phenylrestes können sie sich in ortho-, meta- oder para-Stellung zueinander befinden.

**[0062]** Der Begriff "Aralkyl" bezieht sich auf eine Arylgruppe, die an einen Niederalkylrest gebunden ist. Beispiele für Aralkylgruppen sind Benzyl-, 2-Phenylethyl- und 2-(2-Naphthylethyl)-gruppen.

**[0063]** Der Begriff "Aralkenyl" bezieht sich auf eine Arylgruppe, die mit einem vollständig konjugierten Alkenylrest verbunden ist. Beispiele für Aralkenylgruppen sind Styrenyl-(cis und trans), 1-Phenylbutadienyl- und 1-Naphthylbutadienylgruppen (einschließlich aller möglichen Kombinationen der Z- und E-Isomeren an den Doppelbindungen).

**[0064]** Der Begriff "Halogen" bezieht sich auf Fluor-, Brom-, Chlor- und Iodreste.

**[0065]** Der Begriff "Niederalkylthio" bezieht sich auf die Gruppen R-S-, wobei der Rest R eine Niederalkylgruppe ist.

**[0066]** Der Begriff "Abgangsgruppe" bezieht sich auf eine Gruppe, die in einer chemischen Reaktion durch ein Nucleophil, z. B. Halogenid, Alkylsulfonate (z. B. Methansulfonat), Arylsulfonate, Phosphate, Sulfonsäure, Sulfonsäuresalze, Imidazolide, N-Hydroxysuccinimide und dergleichen ersetzt werden kann.

**[0067]** Der Begriff "Linker" bezieht sich auf jegliche chemisch und biologisch verträgliche kovalente Atomgruppierung, die zur Verbindung der erfindungsgemäß verwendeten ersten und zweiten Reagenzien dienen kann. Im allgemeinen haben bevorzugte Linker von Ende zu Ende 20 bis 40 Bindungen, vorzugsweise 25 bis 30 Bindungen, und sie können verzweigt- oder geradkettig sein oder Ringe enthalten. Die Bindungen können Kohlenstoff-Kohlenstoff-, Kohlenstoff-Heteroatom- oder Heteroatom-Heteroatom-Bindungen sein. Die Verbindung kann hydrophob oder hydrophil gestaltet sein. Die verbindende Gruppe kann Einfach- und/oder Doppelbindungen, 0 bis 10 Heteroatome (wobei Sauerstoff und Schwefel bevorzugt sind) und gesättigte oder aromatische Ringe enthalten. Die verbindende Gruppe kann Gruppierungen wie Ester, Ether, Sulfid, Disulfid und dergleichen enthalten.

**[0068]** Der Begriff "amphiphil" betrifft ein Molekül mit sowohl einem hydrophilen als auch einem hydrophoben Anteil.

**[0069]** Es werden Verfahren und Zusammensetzungen zum Nachweis von Änderungen des Membranpotentials in biologischen Systemen bereitgestellt. Ein Aspekt des Nachweisverfahrens umfasst:

- (a) Einführen eines ersten Reagenz, umfassend ein hydrophobes fluoreszierendes Anion, das sich von einer ersten Membranfläche zu einer zweiten Membranfläche als Antwort auf Veränderungen des Membranpotentials umverteilen kann;
- (b) Einführen eines zweiten Reagenz, das die erste oder zweite Membranfläche markiert, wobei das zweite Reagenz ein Fluorophor umfasst, das einem Energietransfer unterliegen kann, entweder durch (i) Abgeben

von Energie des angeregten Zustands an das fluoreszierende Anion oder (ii) Aufnehmen von Energie des angeregten Zustands vom fluoreszierenden Anion;

(c) Aussetzen der Membran gegenüber Anregungslicht einer geeigneten Wellenlänge;

(d) Messen des Energietransfers zwischen dem fluoreszierenden Anion und dem zweiten Reagenz; und

(e) In-Beziehung-Setzen des Energietransfers zu der Änderung des Membranpotentials.

**[0070]** Erfindungsgemäß können die ersten und zweiten Reagenzien nur dann durch einen Linker miteinander verbunden sein, wenn das zweite Reagenz ein grün fluoreszierendes Protein, ein fluoreszierend markiertes Protein oder ein Coumarin umfasst. In allen anderen Ausführungsformen können die ersten und zweiten Reagenzien nicht durch eine Linkergruppe miteinander verbunden sein.

**[0071]** Der bevorzugte Energietransfer-Modus ist der Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Das Verfahren ist besonders geeignet zum Nachweis von Änderungen des Membranpotentials der Plasmamembran in biologischen Zellen.

**[0072]** Die in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Zusammensetzungen umfassen zwei Reagenzien. Das erste Reagenz umfaßt ein hydrophobes fluoreszierendes Anion, das sich schnell von einer Oberfläche der Plasmamembran zur anderen als Antwort auf Änderungen des Transmembranpotentials umverteilt. Diese Spezies wird als das mobile oder das hydrophobe Anion bezeichnet. Das zweite Reagenz umfaßt ein Fluorophor, das einem Energietransfer unterliegen kann, entweder durch (i) Abgeben von Energie des angeregten Zustands an das fluoreszierende Anion oder (ii) Aufnehmen von Energie des angeregten Zustands vom fluoreszierenden Anion, typischerweise durch FRET.

**[0073]** Die ersten und zweiten Reagenzien sind zueinander spektroskopisch komplementär, was bedeutet, daß ihre spektralen Eigenschaften derart sind, daß zwischen ihnen ein Transfer von Energie des angeregten Zustands stattfinden kann. Jedes der Reagenzien kann als Donor oder Akzeptor wirken, wobei dann das andere Reagenz entsprechend komplementär ist, d. h. der Akzeptor bzw. Donor. Sowohl FRET als auch das Quenching sind sehr empfindlich gegenüber dem Abstand zwischen den beiden Spezies. Beispielsweise verändert sich das bei FRET beobachtete Quenching des Nichtstrahlungs-Förster-Typs invers mit der sechsten Potenz des Abstands zwischen der Donor- und der Akzeptor-Spezies. Wenn sich das Membranpotential ändert und das hydrophobe fluoreszierende Anion sich entweder vom zweiten Reagenz entfernt oder sich annähert, wird daher der FRET zwischen den beiden Reagenzien entweder signifikant verringert oder verstärkt. Andere Mechanismen wie Elektronentransfer, Dexter-Austauschwechselwirkung, paramagnetisches Quenching und beschleunigtes Intersystem-Crossing weisen sogar eine noch kürzere Reichweite auf und erfordern, daß die beiden Reagenzien aneinanderstoßen oder sich mindestens auf 1 nm annähern.

**[0074]** Bisher beschriebene spannungsempfindliche Fluoreszenzindikatoren, die durch Potential-getriebene Umverteilung des Fluorophors durch die Membran wirken, hatten Antwortzeiten von größer als 100 ms, häufig Minuten. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt stark fluoreszierende anionische Farbstoffe bereit, die sehr viel schneller durch die Membran translocieren, und zwar mit exponentiellen Zeitkonstanten von typischerweise weniger als 10 ms, häufig weniger als 5 ms, sehr häufig von etwa 1 bis 3 ms und insbesondere weniger als 1 ms (z. B. 0,1 bis 1 ms). Diese Translokationsgeschwindigkeiten sind von der Gegenwart des zweiten Reagenz auf der extrazellulären Oberfläche der Membran unabhängig. Antwortzeiten von kleiner 1 ms sind zur genauen Messung von einfachen Aktionspotentialen in einzelnen Neuronen notwendig und werden mit einigen der hier beschriebenen Farbstoffe (z. B. Hexyl-substituiertem Pentamethinonol, DiSBA-C<sub>6</sub>-5) erhalten. Andere hier beschriebene Farbstoffe weisen Antwortzeiten im Bereich von 2 bis 5 ms auf, die schnell genug sind, um Spannungsänderungen in Herz- und glatten Muskelzellen, viele synaptische Potentiale in einzelnen Neuronen und die durchschnittliche Signalaktivität in Neuron-Populationen (z. B. Aufzeichnung der elektrischen Antworten verschiedener Regionen des Zentralnervensystems auf sensorische Reize) zu kontrollieren. Die erfindungsgemäßen Indikatoren können auch langsameren Spannungsänderungen über einen Zeitbereich von Sekunden bis Minuten folgen.

#### I. Erstes Reagenz – Hydrophobe fluoreszierende Anionen

**[0075]** In den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren umfaßt das erste Reagenz ein hydrophobes Ion (Fluoreszenz-Donor, -Akzeptor oder -Quencher), das als Spannungssensor dient und sich innerhalb der Membran als Antwort auf Änderungen des Transmembranpotentials von einer Membran-Oberfläche zur anderen bewegt. Die Verteilung von hydrophoben Ionen zwischen den beiden wäßrigen Membran-Grenzflächen (der extrazellulären und intrazellulären Grenzfläche) wird durch das Membranpotential festgelegt. Kationen werden sich an der negativ geladenen Membran-Grenzfläche ansammeln und entsprechend werden

sich Anionen zur positiv geladenen Grenzfläche bewegen. Die erfindungsgemäße inhärente Empfindlichkeit basiert auf den großen Konzentrationsänderungen des mobilen Ions an der Grenzfläche bei physiologisch relevanten Änderungen des Membranpotentials. Potentiell erzeugt eine Änderung von 60 mV eine 10fache Änderung im Verhältnis der Anion-Konzentrationen an den jeweiligen Grenzflächen. Die erfindungsgemäßen Verfahren koppeln diese Änderung der Grenzflächen-Konzentration mit einem effizienten Fluoreszenzsignal, und stellen damit ein empfindliches Verfahren zum Nachweis von Änderungen des Transmembranpotentials bereit. Die Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung hängt von der Membran-Translokationsgeschwindigkeit des hydrophoben Ions ab.

**[0076]** Vorzugsweise sind die durch die Plasmamembran translocierenden fluoreszierenden Ionen hydrophob, um fest an die Plasmamembran zu binden und schnell als Antwort auf Änderungen des Transmembranpotentials durch die Plasmamembran zu translocieren. Vorzugsweise wird das Ion einfach geladen sein, wobei die Ladung über einen signifikanten Teil des Farbstoffions, vorzugsweise über das gesamte Farbstoffion delokalisiert sein wird. Die Ladungsdelokalisierung verringert die Bornsche Ladungsenergie (umgekehrt proportional zum Anionenradius), die erforderlich ist, um ein geladenes Molekül von einer hydrophilen in eine hydrophobe Umgebung zu bewegen und sie erleichtert eine schnelle Translokation von Ionen (R. Benz, 1988, "Structural requirement for the rapid movement of charged molecules across membranes", *Biophys. J.* 54, 25–33). Die Erhöhung der Hydrophobie beschränkt die Freisetzung des gebundenen Farbstoffs von der Plasmamembran auf ein Mindestmaß und führt zu einer tieferen Einlagerung des Ions in die Membran, was die elektrostatische Aktivierungsenergie für die Translokation verringert. Polare Gruppen auf dem Ion sollten bei einem Minimum gehalten und so stark wie möglich abgeschirmt werden, um eine Solvatation im Kopfgruppenbereich der Doppelschicht zu vermeiden. Die Hydrophobie kann jedoch nicht unbeschränkt erhöht werden, da eine gewisse Löslichkeit im wässrigen Medium erforderlich ist, um ein zelluläres Beladen zuzulassen. Falls notwendig, können die Farbstoffe mit Hilfe von amphiphilen Solubilisierungsreagenzien wie beta-Cyclodextrin, Pluronic wie Pluronic F-127 oder Polyethylenglykolen wie PEG 400 beladen werden, die die Solubilisierung der hydrophoben Ionen in wässriger Lösung unterstützen.

**[0077]** Der Begriff "hydrophob" bezieht sich, wenn er im Zusammenhang mit dem hydrophoben Ion verwendet wird, auf eine Spezies, deren Verteilungskoeffizient zwischen einer physiologischen Salzlösung (z. B. HBSS) und Octanol vorzugsweise mindestens etwa 50 und mehr bevorzugt mindestens etwa 1000 beträgt. Der Adsorptionskoeffizient der Spezies an eine Phospholipid-Doppelschicht (wie z. B. eine von menschlichen roten Blutzellen stammende Membran) beträgt mindestens etwa 100 nm, vorzugsweise mindestens etwa 300 nm (wobei die Membran 3 nm dick ist). Verfahren zur Bestimmung von Verteilungs- und Adsorptionskoeffizienten sind bekannt.

**[0078]** Es ist im allgemeinen bevorzugt, daß der hydrophobe Farbstoff eine anionische Spezies ist. Estergruppen biologischer Membranen erzeugen ein beträchtliches Dipolpotential innerhalb des Kohlenwasserstoffkerns der Membran. Dieses Potential unterstützt die Translokation von Anionen durch die hydrophobe Schicht, hält jedoch Kationen zurück. Was die Membran-Translokation angeht, haben Anionen somit einen enormen inhärenten Geschwindigkeitsvorteil gegenüber Kationen. Beispielsweise ist für die isostrukturellen Ionen Tetraphenylphosphonium-Kation und Tetraphenylphosphat-Anion bekannt, daß das Anion eine viel höhere Permeabilität als das Kation aufweist (R. F. Flewelling und W. L. Hubbell, 1986, "The membrane dipole potential in a total membrane potential model", *Biophys. J.* 49, 541–552).

**[0079]** Vorzugsweise sollten die Anionen stark fluoreszieren, wenn sie an der Membran adsorbiert sind, wohingegen sie frei in wässriger Lösung nur eine minimale Fluoreszenz zeigen sollten. Vorzugsweise sollte die Intensität der anionischen Fluorophore mindestens viermal und vorzugsweise mindestens achtmal höher sein, wenn sie an der Membran adsorbiert sind. Die Fluoreszenz der hier beschriebenen Thiobarbituratoxonole ist in der Membran etwa 20 mal stärker als in Wasser. Wenn der Farbstoff sehr stark an die Membran gebunden ist, wäre prinzipiell kein großes Fluoreszenzverhältnis des an die Membran gebundenen Farbstoffs im Vergleich zu frei in wässriger Lösung vorliegendem Farbstoff erforderlich; da jedoch in Wirklichkeit das Membranvolumen im Verhältnis zum Volumen der wässrigen Lösung sehr gering ist und eine gewisse Wasserlöslichkeit zum Beladen des Farbstoffs in Zellen und Gewebe notwendig ist, ist es erwünscht, daß das erste Reagenz eine mindestens etwa viermal stärkere Fluoreszenz in einer Membran als in wässriger Lösung aufweist.

**[0080]** Die Anionen sollten auch nicht als Ionophore wirken, insbesondere nicht als Protonophore, da ein solches Verhalten anhaltende Leckströme verursachen kann. Daher liegt der pKa der Protonierung des Anions typischerweise deutlich unter 7, vorzugsweise unter 5 und insbesondere unter 3. Anregungs- und Emissionswellenlängen im roten bis infraroten Bereich sind bevorzugt, um Gewebestreuung und Häm-Absorption zu vermeiden. Eine photodynamische Beschädigung sollte möglichst niedrig gehalten werden, und zwar vorzugs-

weise am besten dadurch, daß die Bildung von Triplett-Zuständen und die daraus resultierende Bildung von Singulett-Sauerstoff auf ein Mindestmaß reduziert wird.

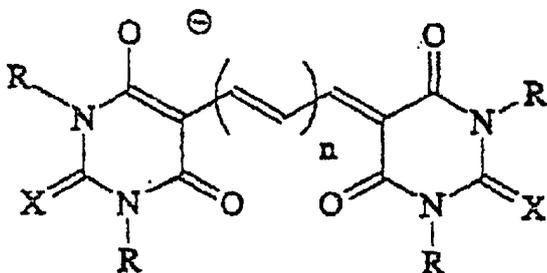
**[0081]** Die fluoreszierenden hydrophoben Ionen beinhalten Polymethinoxonole, Tetraarylborate, die mit Fluorophoren konjugiert sind, und fluoreszierende Komplexe von Seltenerd- und Übergangsmetallen.

#### A. Polymethinoxonole

**[0082]** Der Begriff "Polymethinoxonol" bezieht sich auf Moleküle, die zwei potentiell saure Gruppen umfassen, die mittels einer Polymethinkette verbunden sind, und eine zwischen den beiden sauren Gruppen delokalisierte einzelne negative Ladung besitzen. Die bevorzugten sauren Gruppen sind Barbiturate oder Thiobarbiturate. Sie können symmetrisch oder asymmetrisch sein, d. h. jedes der zwei (Thio-)Barbiturate kann gleich oder verschieden sein. Die symmetrischen (Thio-)Barbituratoxonole werden durch die herkömmlichen Kürzel DiBA-C<sub>n</sub>(x) und DiSBA-C<sub>n</sub>(x) bezeichnet, wobei sich DiBA auf die Gegenwart von zwei Barbituraten, DiSBA auf die Gegenwart von zwei Thiobarbituraten bezieht, C<sub>n</sub> Alkylsubstituenten mit n Kohlenstoffatomen an den Stickstoffatomen der (Thio-)Barbiturate darstellt und x die Anzahl von Kohlenstoffatomen in der Polymethinkette ist, die die (Thio-)Barbiturate verbindet. Es wurde überraschend entdeckt, daß Oxonole mit langkettigen Alkylsubstituenten (z. B. mit C<sub>n</sub> größer als Hexyl, insbesondere Decyl in den Pentamethinoxonolen) überraschend schnell durch die Plasmamembranen translocieren.

**[0083]** Eine außerordentlich nützliche Eigenschaft dieser Oxonole ist, daß ihr Fluoreszenzemissions-Maximum bei 560 nm bei Bindung an Membranen 20mal intensiver ist als in wäßriger Lösung [T. J. Rink, C. Montecucco, T. R. Hesketh und R. Y. Tsien, 1980, Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent grobes, Biochim. Biophys. Acta 595, 15–30]. Darüber hinaus ist die negative Ladung über dem Chromophor delokalisiert, wobei die vier äquivalenten Sauerstoffatome den Hauptteil der Ladung tragen. Die hohe Elektronenaffinität der Thiobarbituratreste verhindert eine Protonierung (pK<sub>a</sub> < 1) und verhindert ein photooxidatives Bleichen. Die vier N-Alkylgruppen und die Thiocarbonylgruppe verleihen dem Molekül ein notwendiges Maß an Hydrophobie, das für eine feste Bindung an die Membran und eine schnelle Translokation erforderlich ist.

**[0084]** Erfindungsgemäß verwendete Oxonolverbindungen haben die allgemeine Formel I



Formel I

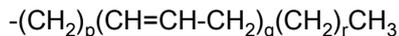
in der der Rest R unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einer Hydrocarbyl- und einer Heteroalkylgruppe, der Rest X unabhängig ein Sauerstoff- oder Schwefelatom ist und n eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist, und Salze davon.

**[0085]** Die Oxonol-Anionen werden üblicherweise als Salze beladen, wobei das Kation typischerweise H<sup>+</sup>, ein Alkalimetall-, substituiertes Ammonium- oder Pyridiniumion ist.

**[0086]** Vorzugsweise ist der Rest X ein Schwefelatom, d. h. das hydrophobe Anion ist ein Bis-(1,3-dialkyl-2-thiobarbiturat)-polymethinoxonol oder ein Derivat davon.

**[0087]** Wenn der Rest R eine Hydrocarbylgruppe ist, kann sie unabhängig ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Alkyl-, Aryl-, Aralkyl-, Cycloalkyl- und Cycloalkyl-niederalkylgruppen. Typischerweise haben diese Gruppen 4 bis etwa 40 Kohlenstoffatome, mehr bevorzugt etwa 5 bis etwa 20 Kohlenstoffatome. Arylgruppen können mit Hydrocarbyl-, Alkyl-, Niederalkyl-, Heteroalkyl- und Halogengruppen substituiert sein. Oxonole, in denen die Reste R an einem speziellen (Thio-)Barbituratrest verschieden voneinander sind, sind insbesondere in diese Erfindung einbezogen und können aus unsymmetrischen Harnstoffderivaten hergestellt werden.

**[0088]** In einigen Ausführungsformen ist der Rest R eine Hydrocarbylgruppe der allgemeinen Formel



in der p eine ganze Zahl von 1 bis etwa 20 ist, vorzugsweise etwa 1 bis 2, q eine ganze Zahl von 1 bis etwa 6 ist, vorzugsweise 1 bis 2, die Stereochemie der Doppelbindung(en) cis oder trans sein kann, wobei cis bevorzugt ist, r eine ganze Zahl von 1 bis etwa 20 ist, vorzugsweise etwa 1 bis 3, und  $p + 3q + r + 1 \leq 40$  ist, vorzugsweise etwa 4 bis 20, insbesondere etwa 6 bis 10.

**[0089]** In einer anderen Ausführungsform der Polymethinoxonole ist der Rest R eine Heteroalkylgruppe der allgemeinen Formel



in der der Rest A ein Sauerstoff- oder Schwefelatom ist, x unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis etwa 20, vorzugsweise etwa 10 bis 15 ist, y unabhängig den Wert 0 oder 1 hat, z unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis etwa 20, vorzugsweise etwa 10 bis 15 ist, und  $x + y + z \leq 40$  hat, vorzugsweise eine ganze Zahl von etwa 5 bis 25 und insbesondere etwa 5 bis 10 ist.

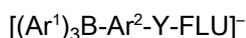
**[0090]** In anderen Ausführungsformen ist der Rest R eine Phenylgruppe, die unabhängig mit bis zu 4 Substituenten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Hydrocarbyl-, Heteroalkyl-, Halogengruppen und Wasserstoffatomen substituiert ist.

**[0091]** In anderen Ausführungsformen beinhaltet einer der vier Reste R einen Linker zu dem zweiten Reagenz, wie nachstehend in Abschnitt III beschrieben.

**[0092]** Die negative Ladung eines Oxonols ist über den gesamten Chromophor verteilt. Bis-(thiobarbiturat)-trimethinoxonole absorbieren bei 542 nm (Extinktionskoeffizient =  $200.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), emittieren bei 560 nm und haben in Octanol eine Quantenausbeute von 0,4. Ein Oxonol mit R = n-Hexyl, DiSBA-C<sub>6</sub>-(3), translociert mit einer Zeitkonstante ( $\tau$ ) < 3 ms in spannungsabgegriffenen Säugerzellen. Die entsprechende Decylverbindung, DiSBA-C<sub>10</sub>-(3) translociert mit einer Zeitkonstante von < 2 ms. Die Anforderungen an das Molekül für eine schnelle Translokation werden durch die symmetrischen Oxonole gut erfüllt. Bis-(thiobarbiturat)-penta-methinoxonole absorbieren bei ~630 nm und emittieren bei ~660 nm. Die negative Ladung ist in solchen rot verschobenen Oxonolen weiter delokalisiert. Wie erwartet sind die Translokationsgeschwindigkeiten der Pentamethinoxonole höher als die der Trimethinoxonole. DiSBA-C<sub>4</sub>-(5) durchquert die Membran mit  $\tau < 3$  ms, also sechsmal schneller als das entsprechende Trimethinoxonol. DiSBA-C<sub>6</sub>-(5) translociert mit  $\tau \sim 0,4$  ms bei 20°C.

#### B. Tetraarylborat-Fluorophor-Konjugate

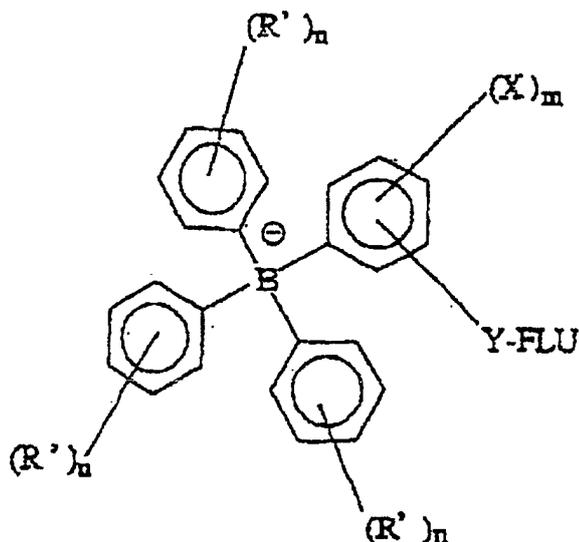
**[0093]** Eine weitere geeignete Klasse von fluoreszierenden hydrophoben Anionen sind Tetraarylborate der allgemeinen Formel II



Formel II

in der der Rest Ar<sup>1</sup> eine Arylgruppe, der Rest Ar<sup>2</sup> eine bifunktionelle Arylengruppe, der Rest B ein Boratom, der Rest Y ein Sauerstoff- oder Schwefelatom und FLU ein neutrales Fluorophor ist.

**[0094]** Häufig ist der Rest Ar<sup>1</sup> mit einer oder zwei Elektronen-ziehenden Gruppen substituiert, wie z. B. CF<sub>3</sub>. In bestimmten Ausführungsformen sind die Reste Ar<sup>1</sup> und Ar<sup>2</sup> gegebenenfalls substituierte Phenylgruppen, wie es nachstehend für die Struktur der allgemeinen Formel III gezeigt ist.



Formel III

in der jeder Rest R' unabhängig ein Wasserstoffatom, eine Hydrocarbyl-, Halogen-,  $\text{CF}_3$ -Gruppe oder eine Linkergruppe, n eine ganze Zahl von 0 bis 5, jeder Rest X unabhängig ein Wasserstoffatom, Halogen oder  $\text{CF}_3$ , m eine ganze Zahl von 0 bis 4, der Rest Y ein Sauerstoff- oder Schwefelatom und FLU ein neutrales Fluorophor ist.

**[0095]** Wenn der Rest R' eine Hydrocarbylgruppe ist, enthält sie typischerweise 1 bis etwa 40, vorzugsweise 3 bis etwa 20 und insbesondere etwa 5 bis 15 Kohlenstoffatome. Vorzugsweise ist der Rest R' eine niedere Alkylgruppe, insbesondere (für eine einfachere Synthese) sind alle Reste R' Wasserstoffatome. Sofern der Rest R' keine Hydrocarbylgruppe ist, ist er häufig die Gruppe  $\text{CF}_3$ , und n hat den Wert 1. In bestimmten Ausführungsformen ist  $X = \text{F}$  und  $m = 4$ . Der Rest X ist typischerweise Elektronen-ziehend, um einen photoinduzierten Elektronentransfer vom Tetraarylborat zum Fluorophor zu verhindern, der die Fluoreszenz des Fluorophors löscht. Insbesondere ist der Rest X ein Fluoratom.

### 1. Synthese von Tetraarylborat-Fluorophor-Konjugaten

**[0096]** Es wurde eine allgemeine Synthese von fluoreszierenden Tetraarylborat-Anionen entwickelt, die in [Fig. 10](#) beispielhaft für ein fluoreszierendes Biman-Tetraarylborat-Konjugat (bezeichnet als Borman, Verbindung IV in [Fig. 10](#)) gezeigt ist.

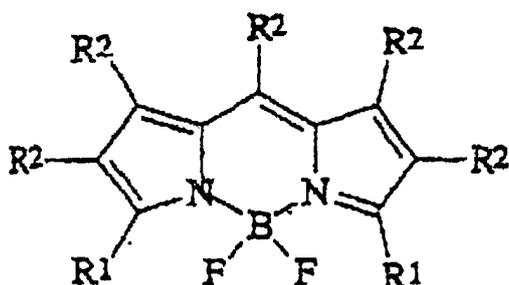
**[0097]** Allgemein wird ein Triarylboran mit einem geschützten Phenoxy- oder Thiophenoxyorganometall-Reagenz umgesetzt, wie z. B. einem Organolithiumderivat. Die Schutzgruppe wird dann entfernt und das ungeschützte Phenol (oder Thiophenol) wird mit einem Fluorophor umgesetzt, das eine Abgangsgruppe trägt. Die nukleophile Substitution der Abgangsgruppe gefolgt von der herkömmlichen Reinigung des Rohprodukts liefert das an das Fluorophor gebundene Tetraarylborat-Anion. Die Substituenten R' und X werden durch geeignete Wahl der Edukte Triarylboran und Phenoxy-(oder Thiophenoxy-)organometallverbindung variiert. Geeignete Edukte sind von Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) und anderen bekannten Herstellern erhältlich. In dieser Spezies wird folglich ein Fluorophor an einen funktionalisierten Boratkern gebunden. Dieses allgemeine Syntheseverfahren erlaubt die Bindung von jeglichem Fluorophor an das Boratanion.

### 2. Neutrale Fluorophore

**[0098]** Da polare Chromophore die Membran-Translokationsgeschwindigkeit erniedrigen, ist es bevorzugt, daß das an das Tetraarylborat gebundene Fluorophor neutral ist. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann ein neutrales Fluorophor als fluoreszierendes Molekül definiert werden, das keine geladenen funktionellen Gruppen enthält. Beispielhafte fluoreszierende Moleküle, die Abgangsgruppen tragen und zur Konjugation geeignet sind, sind von Molecular Probes (Portland, OR), Eastman Kodak (Huntington, TN), Pierce Chemical Co. (Rockville, MD) und anderen bekannten Herstellern erhältlich. Alternativ können Abgangsgruppen mit bekannten Verfahren in fluoreszierende Moleküle eingeführt werden.

**[0099]** Besonders geeignete Klassen neutraler Fluorophore, die an die Tetraarylborate zur erfindungsgemäßen Verwendung gebunden werden können, beinhalten Bimane, Bodipys und Cumarine, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

**[0100]** Bodipys (d. h. Difluorboradiazaindacene) haben die allgemeine Formel IV



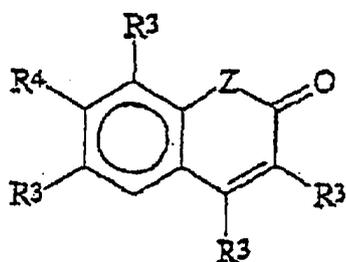
Formel IV

in der jeder Rest  $R^1$ , der gleich oder verschieden sein kann, unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einer Niederalkyl-, Aryl-, heteroaromatischen Gruppe, Aralkenylgruppen und einem Alkylen-Verknüpfungspunkt, jeder Rest  $R^2$ , der gleich oder verschieden sein kann, unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einer Niederalkyl-, Phenylgruppe und einem Alkylen-Verknüpfungspunkt.

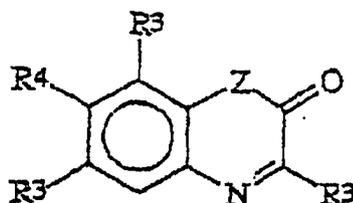
**[0101]** Für die Zwecke dieser Beschreibung bezieht sich der Begriff "Alkylen-Verknüpfungspunkt" auf die Gruppe  $-(CH_2)_t-$  oder  $-(CH_2)_t-C(O)-$ , worin  $t$  eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und eine Valenzbindung an das Fluorophor und die andere Valenzbindung an das Tetraarylborat gebunden ist. Vorzugsweise hat  $t$  den Wert 1, d. h. der Alkylen-Verknüpfungspunkt ist eine Methylengruppe. Dem Fachmann ist klar, daß alle Fluorophore einen Verknüpfungspunkt besitzen, an dem sie mit dem Tetraarylborat verbunden sein können. Im allgemeinen trägt das zur Bindung des Fluorophors an das Tetraarylborat verwendete Vorläufer-Molekül eine Abgangsgruppe am Verknüpfungspunkt. Die Umsetzung dieses Vorläufer-Moleküls mit einem geeigneten Nukleophil am Tetraarylborat (z. B. einem Amin, einer Hydroxygruppe oder einem Thiol) ergibt ein Fluorophor-Tetraarylborat-Konjugat, das am Verknüpfungspunkt verbunden ist. Der Begriff "Verknüpfungspunkt" bezieht sich im weiteren Sinn auf eine chemische Gruppierung, die zur Umsetzung mit entweder einem Fluorophor oder einem bifunktionellen Linker zur Bildung der fluoreszierenden Konjugate und/oder den hier beschriebenen verbundenen ersten und zweiten Reagenzien geeignet ist.

**[0102]** Häufig tragen diese Verknüpfungspunkte Abgangsgruppen wie z. B. Alkyltosylate, aktivierte Ester (Anhydride,  $n$ -Hydroxysuccinimidylester und dergleichen), die mit einem Nukleophil an der zu verbindenden Spezies reagieren. Dem Fachmann ist klar, daß die relative Anordnung der Abgangsgruppe und des Nukleophils an den Molekülen, die miteinander verbunden werden, umgekehrt werden kann.

**[0103]** Cumarine und verwandte Fluorophore können durch die allgemeinen Formeln V und VI



Formel V

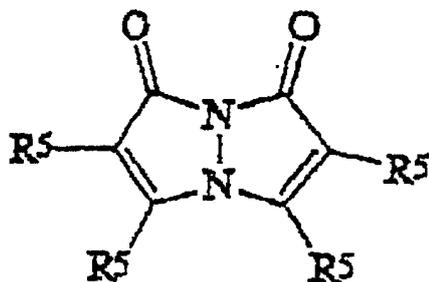


Formel VI

dargestellt werden, worin jeder Rest  $R^3$ , der gleich oder verschieden sein kann, unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, Halogen, niederem Alkyl, CN,  $CF_3$ ,  $COOR^5$ ,  $CON(R^5)_2$ ,  $OR^5$  und einem Verknüpfungspunkt, der Rest  $R^4$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $OR^5$  und  $N(R^5)_2$ , der Rest Z ein Sauerstoff-, Schwefelatom oder  $NR^5$  ist und jeder Rest  $R^5$ , der gleich oder verschieden

sein kann, unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einer niederen Alkylgruppe und einem Alkylen-Verknüpfungspunkt.

[0104] Bimane können durch die allgemeine Formel VII



Formel VII

dargestellt werden, in der jeder Rest  $R^5$ , der gleich oder verschieden sein kann, unabhängig ein Wasserstoffatom, eine niedere Alkylgruppe oder ein Alkylen-Verknüpfungspunkt ist.

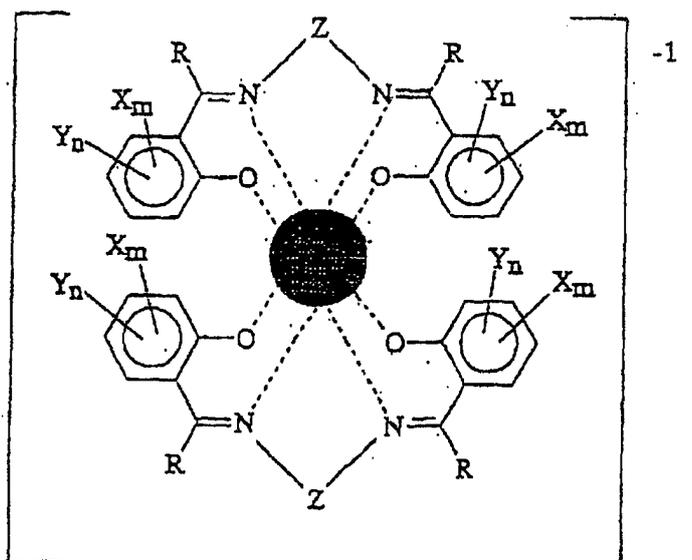
[0105] Fluoreszierende Tetraarylborate mit daran gebundenen Cumarinen und Bimanen wurden hergestellt. Diese fluoreszierenden Borste translocieren mit  $\tau < 3$  ms in spannungsabgegriffenen Fibroblasten. Die Synthese eines beispielhaften fluoreszierenden Tetraarylborats ist in Beispiel V beschrieben.

### C. Fluorophor-Komplexe mit Übergangsmetallen

[0106] Lanthanid-Ionen wie beispielsweise  $Tb^{3+}$  und  $Eu^{3+}$  lumineszieren in den grünen und roten Bereichen des sichtbaren Spektrums mit einer Lebensdauer im Bereich von Millisekunden. Die Emission ist zusammengesetzt aus verschiedenen scharfen Banden, die für den atomaren Ursprung der angeregten Zustände charakteristisch sind. Direkte Anregung der Ionen kann durch Verwendung von tiefem UV-Licht erreicht werden. Eine Anregung der Lanthanid-Ionen bei größeren Wellenlängen ist möglich, wenn die Ionen durch absorbierende Liganden chelatisiert werden, die Anregungsenergie auf die Ionen übertragen können, die dann mit ihrer charakteristischen Emission lumineszieren können, so wie wenn sie direkt angeregt worden wären. Lanthanid-Komplexe von  $Tb^{3+}$  und  $Eu^{3+}$  mit absorbierenden Liganden, die vier negative Ladungen liefern und somit eine Nettoladung von  $-1$  erzeugen, können als mobile Ionen für den spannungsempfindlichen FRET-Mechanismus wirken. Die Lebensdauer von  $Tb^{3+}$  und  $Eu^{3+}$  ist noch ausreichend schnell, um Spannungsänderungen im Millisekundenbereich zu messen.

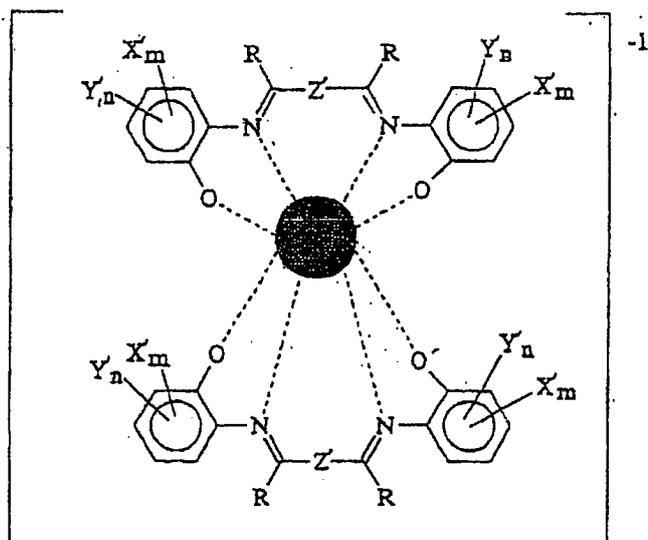
[0107] Die Erfindung stellt auch solche Komplexe bereit, die als fluoreszierendes hydrophobes Anion (als FRET-Donoren) im ersten Reagenz wirken können. Unter Verwendung des Liganden Bis-(salicylaldehyd)ethyldiamin ( $Salen$ )<sup>2-</sup> wurden  $[Tb(Salen)_2]^{-1}$  und  $[Eu(Salen)_2]^{-1}$  hergestellt. Diese Komplexe zeigen eine maximale Absorption bei 350 nm mit einer signifikanten Absorption bis 380 nm und eine Lumineszenz mit der charakteristischen Atomemission (Fig. 10). Die Verwendung von Lanthanid-Komplexen als Donoren bietet einige einzigartige Vorteile. Streuung, zelluläre Autofluoreszenz und Emission von direkt angeregten Akzeptoren besitzt eine Lebensdauer im Nanosekundenbereich oder kürzer und kann durch "Time gating" der Emissionsaufnahme unterdrückt werden (vgl. beispielsweise G. Marriott, M. Heidecker, E. P. Diamandis, Y. Yan-Marriott, 1994, Time-resolved delayed luminescence image microscopy using an europium ion chelate complex, Biophys. J. 67, 957–965). Der Ausschluß der schnellen Emission verringert den Hintergrund und führt zu hervorragenden Signal-Rausch-Verhältnissen. Ein weiterer Hauptvorteil der Verwendung von Lanthanidchelaten als Donoren ist der, daß der FRET-Bereich durch Lateraldiffusion in die Membran während der Lebensdauer des angeregten Zustands verstärkt wird (D. D. Thomas, W. F. Carlsen, L. Stryer, 1978, Fluorescence energy transfer in the rapid diffusion limit, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5746–5750). Diese Eigenschaft verringert den Bedarf für hohe Akzeptorkonzentrationen zur Gewährleistung eines wirksamen FRETs stark. Zusätzlich zur Verringerung der Störung und Belastung des zellulären Systems aufgrund hoher Farbstoffkonzentrationen führt der Diffusions-verstärkte FRET zu einer größeren Spannungsempfindlichkeit im Vergleich zu einem statischen Fall. Lanthanidchelate können auch als asymmetrisch markierte Donoren für mobile Akzeptoren wie die Tri- und Pentamethinoxonole verwendet werden, und zwar mit den gleichen vorstehend diskutierten Vorteilen.

[0108] Beispiele für Lanthanid-Komplexe, die als hydrophobe fluoreszierende Anionen verwendet werden können, sind Verbindungen der allgemeinen Formeln XI und XII



Formel XI

in der  $L_n = Tb, Eu$  oder  $Sm$  ist, der Rest  $R$  unabhängig ein Wasserstoffatom, eine  $C_{1-8}$ -Alkyl-,  $C_{1-8}$ -Cycloalkyl- oder  $C_{1-4}$ -Perfluoralkylgruppe ist, die Reste  $X$  und  $Y$  unabhängig ein Wasserstoffatom,  $F, Cl, Br, I, NO_2, CF_3, C_{1-4}$ -Alkyl,  $CN, Ph, O$ -(Niederalkyl) oder  $OPh$  sind, oder die Reste  $X$  und  $Y$  zusammengenommen die Gruppe  $-CH=CH-$  sind, und der Rest  $Z$  die 1,2-Ethandiyl-, 1,3-Propandiyl-, 2,3-Butandiyl-, 1,2-Cyclohexandiyl-, 1,2-Cyclopentandiyl-, 1,2-Cycloheptandiyl-, 1,2-Phenylendiyl-, 3-Oxa-1,5-pentandiyl-, 3-Aza-3-(niederalkyl)-1,5-pentandiyl-, Pyridin-2,6-bis-(methylen)- oder Tetrahydrofuran-2,5-bis-(methylen)-gruppe ist.



Formel XII

in der  $L_n = Tb, Eu$  oder  $Sm$  ist, der Rest  $R$  unabhängig ein Wasserstoffatom, eine  $C_{1-8}$ -Alkyl-,  $C_{1-8}$ -Cycloalkyl- oder  $C_{1-4}$ -Perfluoralkylgruppe ist, die Reste  $X'$  und  $Y'$  unabhängig ein Wasserstoffatom,  $F, Cl, Br, I, NO_2, CF_3, C_{1-4}$ -Alkyl,  $CN, Ph, O$ -(Niederalkyl) oder  $OPh$  sind, oder die Reste  $X'$  und  $Y'$  zusammengenommen die Gruppe  $-CH=CH-$  sind, und der Rest  $Z'$  unabhängig eine Valenzbindung,  $CR_2$ , die Pyridin-2,6-diyl- oder Tetrahydrofuran-2,5-diylgruppe ist.

## II. Stationäre, asymmetrisch gebundene zweite Reagenzien

**[0109]** Das zweite Reagenz ist ein fluoreszierender Donor, Akzeptor oder Quencher, der komplementär zum ersten Reagenz, dem hydrophoben Anion, ist und entweder an die extrazelluläre oder intrazelluläre Fläche der Plasmamembran bindet. Folglich macht die Gegenwart des zweiten Reagenz auf der einen oder anderen Membranfläche die Membran unsymmetrisch. Wie vorstehend beschrieben erzeugt die Bestrahlung mit Licht

einer geeigneten Wellenlänge eine Fluoreszenzantwort, die sich als Folge der Hin- und Herbewegung des hydrophoben Ions in der Plasmamembran ändert. Dem Fachmann ist klar, daß es zahllose Molekülspezies gibt, die als Fluoreszenz-aktives unsymmetrisch machendes Mittel wirken können. Eine primäre Eigenschaft dieser Komponente ist, daß sie sich auf einer Fläche der Plasmamembran anordnen kann und in einer komplementären Weise (d. h. als Fluoreszenz-Donor, -Akzeptor oder -Quencher) auf das hydrophobe Ion einwirken kann, das sich in der Membran hin- und herbewegt, wenn sich das Transmembranpotential ändert.

**[0110]** Beispiele für zweite Reagenzien sind fluoreszierende Lektine, fluoreszierende Lipide, fluoreszierende Kohlenhydrate mit hydrophoben Substituenten, fluoreszierende Peptide, fluoreszierend markierte Antikörper gegen Membran-Oberflächenbestandteile oder Xanthene, Cyanine und Cumarine mit hydrophoben und hydrophilen Substituenten, und zwar, um die Bindung an Membranen zu fördern und um eine Permeation durch Membranen zu verhindern.

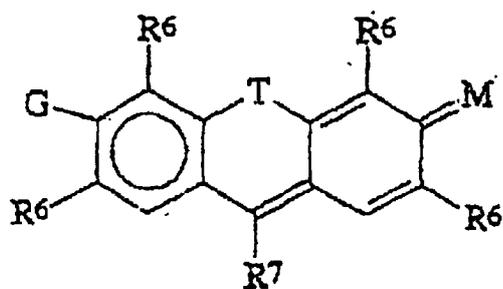
#### A. Fluoreszierende Lektine

**[0111]** Eine Klasse der zweiten Reagenzien sind Lektine, die eine fluoreszierende Markierung tragen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann ein Lektin als Zucker-bindendes Protein definiert werden, das an Glycoproteine und Glycolipide auf der extrazellulären Fläche der Plasmamembran bindet; vgl. J. Roth, "The Lectins: Molecular Probes in Cell Biology and Membrane Research", Exp. Patholo. (Supp. 3) (Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978). Zu den Lektinen gehören Concavalin A, verschiedene Agglutinine (Erbsen-Agglutinin, Erdnuß-Agglutinin, Weizenkeim-Agglutinin und dergleichen), Rizin, A-Kette und dergleichen. Verschiedene Lektine sind von Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, erhältlich.

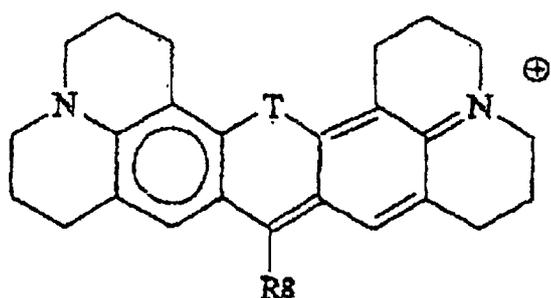
**[0112]** Geeignete Fluoreszenz-Marker zur Verwendung in fluoreszierenden Lektinen sind, ohne darauf beschränkt zu sein, die folgenden: Xanthene (einschließlich Fluoresceine, Rhodamine und Rhodole), Bodipys, Cyanine und lumineszierende Übergangsmetall-Komplexe. Es ist klar, daß die nachstehend beschriebenen Fluoreszenz-Marker nicht nur mit Lektinen sondern auch mit den hier beschriebenen anderen zweiten Reagenzien verwendet werden können. Die bisher besten Ergebnisse mit Lektinen wurden mit Fluorescein-markiertem Weizenkeim-Agglutinin (FL-WGA) erhalten.

#### 1. Xanthene

**[0113]** Eine bevorzugte Klasse von Fluoreszenz-Markern umfaßt Xanthen-Chromophore der allgemeinen Formel VIII oder IX

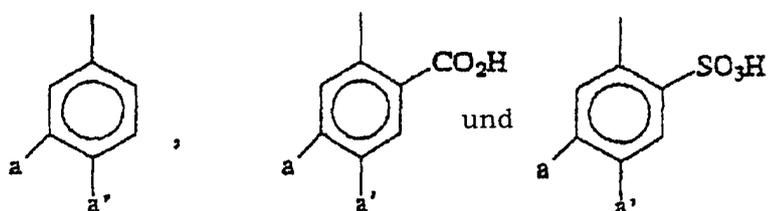


Formel VIII



Formel IX

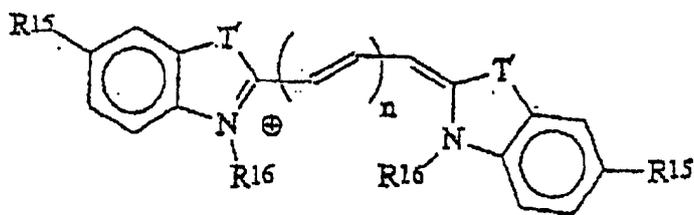
worin der Rest  $R^6$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, Halogen, einer niederen Alkylgruppe,  $SO_3H$  und einem Alkylen-Verknüpfungspunkt, der Rest  $R^7$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einer niederen Alkylgruppe, einem Alkylen-Verknüpfungspunkt und dem Rest  $R^8$ , der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus



worin jeder der Reste  $a$  und  $a'$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom und einem Alkylen-Verknüpfungspunkt, der Rest  $G$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom,  $OH$ ,  $OR^9$ ,  $NR^9R^9$  und einem Alkylen-Verknüpfungspunkt, der Rest  $T$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoff-, Schwefelatom,  $C(CH_3)_2$  und  $NR^9$ , und der Rest  $M$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoffatom und  $NR^9R^9$ , wobei jeder Rest  $R^9$ , der gleich oder verschieden sein kann, unabhängig ein Wasserstoffatom oder eine Hydrocarbylgruppe ist.

## 2. Cyanine

**[0114]** Eine weitere bevorzugte Klasse von Fluoreszenz-Markern sind Cyanin-Farbstoffe der allgemeinen Formel X



Formel X

in der der Rest  $R^{15}$  unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, Halogen, einer niederen Alkylgruppe,  $SO_3H$ ,  $PO_3H_2$ ,  $OPO_3H_2$ ,  $COOH$  und einem Alkyl-Verknüpfungspunkt, der Rest  $R^{16}$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffatom, einer niederen Alkylgruppe,  $(CH_2)_jCOOH$ ,  $(CH_2)_jSO_3H$  und einem Alkyl-Verknüpfungspunkt, wobei  $j$  eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist, der Rest  $T'$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem Sauerstoff-, Schwefelatom,  $C(CH_3)_2$ ,  $-CH=CH-$  und  $NR^{17}$ , wobei der Rest  $R^{17}$  ein Wasserstoffatom oder eine Hydrocarbylgruppe ist und  $n$  eine ganze Zahl von 1 bis 6 ist.

### B. Fluoreszierende Lipide

**[0115]** Fluoreszierend markierte amphipathische Lipide, insbesondere Phospholipide, wurden auch erfolgreich verwendet. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann ein amphipathisches Lipid als Molekül definiert werden, das sowohl hydrophobe als auch hydrophile Gruppen besitzt, die an die Zellmembran binden, aber sie nicht einfach durchdringen. Fluoreszierend markierte Phospholipide sind als zweites Reagenz besonders wertvoll.

**[0116]** Wie hier definiert, beinhalten "Phospholipide" Phosphatidsäure (PA) und Phosphatidylglycerine (PG), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserine (PS) und Phosphatidylcholin, -serin, -inositol, -ethanolamin-Lipid-Derivate wie Phosphatidylcholin aus Hühner- (EPC), Dilauroylphosphatidylethanolamin, Dimyristoylphosphatidylethanolamin, Dipalmitoylphosphatidylethanolamin, Distearoylphosphatidylethanolamin, Dioleoylphosphatidylethanolamin, Distearoylphosphatidylserin, Dilinoleoylphosphatidylinositol und Gemische davon. Die Lipide können ungesättigt sein und natürlich vorkommen oder synthetisch sein. Die einzelnen Phosphatidsäure-Komponenten können symmetrisch oder unsymmetrisch sein, d. h. beide Acylreste sind gleich oder verschieden.

**[0117]** Verschiedene bevorzugte Ausführungsformen beinhalten 6-Chlor-7-hydroxycumarin-markiertes Phosphatidylethanolamin (Cou-PE), Fluorescein-markiertes Phosphatidylethanolamin (FL-PE), N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-phosphatidylethanolamin (NBD-PE) und 5,5'-Disulfoindodicarbocyanin-markiertes Phosphatidylethanolamin (Cy5-PE). Die fluoreszierende Gruppe wird zweckmäßig aus den vorstehend zur Herstellung von fluoreszierenden Lektinen als zweckmäßig beschriebenen Gruppen ausgewählt. Bevorzugte fluoreszierende Phospholipide beinhalten Cou-PE, FL-PE, NBD-PE oder Cy5-PE. Die Verwendung von Cou-PE als Donor mit DiSBA- $C_6$ -(3) als Akzeptor ergab eine Verhältnisänderung von 80% für eine Änderung des Plasmamembranpotentials von 100 mV und ergibt typischerweise Verhältnissignale, die doppelt so groß sind wie die von FL-WGA mit dem gleichen Oxonol.

### C. Fluoreszierend markierte Antikörper

**[0118]** Antikörper, die gegen Oberflächen-Antigene wie Glycolipide oder Membranproteine gerichtet sind, können auch fluoreszierend markiert und als zweite Reagenzien verwendet werden. Beispielsweise färben FITC-markierte Antikörper gegen das Glycolipid GD3 die äußere Oberfläche der Melanozelllinie M21 und ergeben Verhältnisänderungen von bis zu 10%/100 mV unter Verwendung von DiSBA- $C_6$ -(3) als mobiles fluoreszierendes Anion. Eine Spezifität für bestimmte Zelltypen ist wahrscheinlich mit Antikörpern einfacher zu erreichen als mit Lektinen, da Antikörper gegen nahezu jeglichen Oberflächen-Marker erzeugt werden können. Auch mikroinjizierte Antikörper könnten Stellen auf der Cytoplasmfläche der Plasmamembran markieren, an denen Kohlenhydrat-Bindungsstellen für Lektine abwesend sind.

### D. Cytochrome

**[0119]** Es wurde auch entdeckt, daß als zweites Reagenz verwendetes Cytochrom C als Quencher wirkt, der an die äußere Plasmamembran-Oberfläche bindet. Demgemäß umfassen andere geeignete Klassen von

zweiten Reagenzien Cytochrom C oder Apocytochrom C, und zwar mit oder ohne fluoreszierende Gruppe, wie es vorstehend im Zusammenhang mit anderen zweiten Reagenzien beschrieben wurde.

#### E. Fluoreszierende Kohlenhydrate

**[0120]** Eine weitere bevorzugte Klasse von Ausführungsformen des zweiten Reagenz beinhaltet fluoreszierend markierte amphipathische Kohlenhydrate, z. B. Cyclodextrine, die selektiv und stark an die extrazelluläre Plasmamembran-Oberfläche binden. Typischerweise sind die Kohlenhydrate mit einem hydrophoben Schwanz funktionalisiert, um die Interkalation in die Membran und eine feste Bindung an die Membran zu erleichtern. Der cyclische Zucker verleiht eine gute Wasserlöslichkeit für das zelluläre Beladen und verhindert eine Membran-Translokation. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Cyclodextrine das Beladen des Oxonols erleichtern.

#### F. Fluoreszierende Peptide und Proteine

**[0121]** Eine weitere bevorzugte Klasse von Ausführungsformen des zweiten Reagenz beinhaltet fluoreszierend markierte amphipathische Peptide. Solche Peptide enthalten typischerweise mehrere basische Reste wie Lysine und Arginine, um elektrostatisch an negativ geladene Phospholipidgruppen zu binden, sowie mehrere hydrophobe Reste zur Verankerung des Peptids an der Membran. Gegebenenfalls können langkettige Alkylsubstituenten wie N-Myristoyl-, N-Palmitoyl-, S-Palmitoyl- oder C-terminale Prenylgruppen hydrophobe Eigenschaften bereitstellen. Die fluoreszierende Markierung wird typischerweise mittels Lysin- $\epsilon$ -Aminogruppen oder Cystein-Sulphydrylgruppen verbunden.

**[0122]** Eine weitere bevorzugte Klasse von Ausführungsformen des zweiten Reagenz beinhaltet natürliche fluoreszierende Proteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) von *Aequorea victoria* (A. B. Cubitt et al., 1995, Understanding, improving, and using green fluorescent Proteins, Trends Biochem. Sci. 20, 448–455; M. Chalfie und D. C. Prasher, US-PS 5,491,084). Solche Proteine würden an native Plasmamembran-Proteine durch Expression von Tandem-DNA-Konstrukten fusionieren, in denen die das GFP und das native Protein kodierenden DNA-Sequenzen hintereinander verknüpft sind. Alternativ könnte das GFP an ein Motiv fusioniert sein, das eine Bindung von Glycosylphosphatidylinositol-Ankern und eine Zielsteuerung des Proteins an die Plasmamembran verursacht.

**[0123]** Aufgrund der vorstehenden Diskussion ist dem Fachmann klar, daß eine Vielzahl von bekannten Donor/Akzeptor-Paaren als erste und zweite Reagenzien verwendet werden können. Besonders bevorzugte Kombinationen sind, ohne darauf beschränkt zu sein, die folgenden, in denen das erstgenannte Fluorophor der Donor und das als zweites genannte Fluorophor der Akzeptor ist: Fluorescein/Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol, GFP/Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol, GFP/Bis-thiobarbiturat-pentamethinoxonol, Cumarin/Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol, Cumarin/Bis-thiobarbiturat-pentamethinoxonol, Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol/Texas-Rot, Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol/Resorufin, Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol/Cy5, Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol/Bis-thiobarbiturat-pentamethinoxonol, Texas-Rot/Bis-thiobarbiturat-pentamethinoxonol, NBD/Bis-thiobarbiturat-trimethinoxonol, NBD/Bis-thiobarbiturat-pentamethinoxonol.

#### III. Linker-Gruppen zwischen dem ersten und zweiten Reagenz

**[0124]** In einigen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren wird eine Linker-Gruppe zwischen den ersten und zweiten Fluorophoren eingesetzt. Die Linker-Gruppe gewährleistet einen bestimmten minimalen Abstand zwischen den ersten und zweiten Fluorophoren und stellt einen wirksamen Energietransfer zwischen dem Donor und dem Akzeptor (oder Fluorophor und Quencher) sicher, wenn sie sich auf der gleichen Membranseite befinden, selbst bei niedrigen Konzentrationen. Der gute Energietransfer läßt es zu, die Donor-Emission weiter von der Akzeptor-Absorption zu trennen und somit das spektrale Übersprechen zu verringern, was zur Verringerung der spannungsempfindlichen Verhältnisänderung von theoretischen Werten beiträgt. Ein weiterer Hauptvorteil eines Linkers ist der, daß er das System in ein unimolekulares System umwandelt. Dadurch wird die Fluoreszenzmessung stark vereinfacht, eine 1:1-Stöchiometrie von Donor und Akzeptor (oder Fluorophor und Quencher) gewährleistet und der Bedarf einer Optimierung der relativen Beladeniveaus von Donor und Akzeptor für eine optimale spannungsempfindliche Fluoreszenzänderung wird ausgeschlossen (mit dem zusätzlichen Vorteil einer minimalen zellulären Störung und Toxizität). Die Linker-Gruppe ist ausreichend lang, um sich durch die gesamte Membran zu erstrecken.

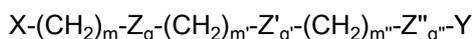
**[0125]** Das hydrophobe fluoreszierende Anion und das zweite Reagenz werden mittels eines bifunktionellen Linkers aneinander gebunden. "Linker-Gruppe" soll den "chemischen Arm" zwischen dem ersten und zweiten

Reagenz bezeichnen. Dem Fachmann ist klar, daß jeder der Reaktanten die notwendigen reaktiven Gruppen enthalten muß, um die erforderliche chemische Struktur zu erhalten.

**[0126]** Beispiele für Kombinationen solcher Gruppen sind Aminogruppen mit Carboxylgruppen zur Bildung von Amidbindungen, Carboxylgruppen mit Hydroxygruppen zur Bildung von Esterbindungen, Aminogruppen mit Alkylhalogeniden zur Bildung von Alkylaminobindungen, Thiole mit Thiolen zur Bildung von Disulfiden oder Thiole mit Maleinimiden oder Alkylhalogeniden zur Bildung von Thioethern. Es ist offensichtlich, daß Hydroxyl-, Carboxyl-, Aminogruppen und andere funktionelle Gruppen, falls abwesend, durch bekannte Verfahren eingeführt werden können. Es ist gleichermaßen bekannt, daß eine Vielzahl von verbindenden Gruppen verwendet werden kann. Die Struktur der Verbindung sollte eine stabile kovalente Bindung sein, die zur Bindung der beiden Spezies aneinander gebildet wird. Die Abschnitte des Linkers, die sich am dichtesten am zweiten Reagenz befinden, können hydrophil sein, wohingegen die Abschnitte des Linkers, die sich am dichtesten am mobilen fluoreszierenden Anion befinden, hydrophob sein sollten, um die Insertion in die Membran zuzulassen und um ein Verzögern der spannungsabhängigen Translokation des Anions zu vermeiden. Die kovalenten Bindungen sollten im Verhältnis zu den Lösungsbedingungen, bei denen die Zellen beladen werden, stabil sein. Im allgemeinen bevorzugte verbindende Gruppen umfassen 20 bis 40 Bindungen von einem Ende zum anderen und 0 bis 10 Heteroatome (NH, O, S) und können verzweigt- oder geradkettig sein. Ohne die vorstehenden Ausführungen zu beschränken, sollte dem Fachmann klar sein, daß nur Kombinationen von chemisch verträglichen Atomen die verbindende Gruppe umfassen können. So sind beispielsweise Amid-, Ester-, Thioether-, Thioester-, Keto-, Hydroxyl-, Carboxyl- und Ethergruppen in Kombinationen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen geeignete Beispiele für chemisch verträgliche verbindende Gruppen. Weitere chemisch kompatible Linker sind in den US-PSen 5,470,997 (Spalte 2 und Spalten 4–7) und 5,470,843 (Spalten 11–13) beschrieben.

**[0127]** Asymmetrische 1,3-substituierte Thioharnstoffe wurden zur Verwendung bei der Synthese von Oxonolen mit N-substituierten Linkern hergestellt, wobei die Linker endständige reaktive Gruppen enthalten, die an ein geeignetes zweites Reagenz (Fluorophore/Quencher) binden können. In einem Beispiel ist einer der Oxonolsubstituenten eine Pentylkette (C<sub>5</sub>) mit einer endständigen Bromid- oder Tosylatgruppe. Aus diesen Thioharnstoffen und Diethylmalonat in Ethanolat/Ethanol wurden Thiobarbiturate hergestellt. Gemischte Pentamethinoxonole, die aus einem Äquivalent des Barbiturats mit funktionalisierten Linkern und 1,3-Dibutylthio-barbiturat hergestellt wurden, sind charakterisiert worden. Ein Synthesebeispiel ist in [Fig. 11](#) abgebildet. Es ist klar, daß Oxonole mit Alkylketten, die von C<sub>5</sub>-Alkylketten verschieden sind, einfach durch ein solches Verfahren hergestellt werden können. Diese Oxonole liegen innerhalb des Bereichs dieser Erfindung.

**[0128]** Eine bevorzugte Klasse von geeigneten Linkern beinhaltet bifunktionalisierte Polyalkylenglykol-Oligomere (Polyethylenglykol, Polypropylenglykol, Polybutylenglykol, usw.) mit einer Länge, die geeignet ist, sich über die Plasmamembran zu erstrecken (25 bis 30 Kohlenstoff-Äquivalente), beispielsweise 8 bis 10 PEG-Einheiten. Das Sauerstoffatom (oder das Schwefelatom in den entsprechenden Thio-Analoga davon) stellt die Hydrophobie ein und damit die Translokationsgeschwindigkeit und das Beladen. Verbindungen, die durch solche Linker-Gruppen verbunden sind, haben die allgemeine Formel



in der der Rest X ein hydrophobes fluoreszierendes Anion, der Rest Y ein fluoreszierendes zweites Reagenz, das ein grün fluoreszierendes Protein, ein fluoreszierend markiertes Protein oder ein Coumarin umfasst, ist, die Reste Z, Z' und Z'' unabhängig ein Sauerstoff-, Schwefelatom, SS, CO, COO sind, m, m' und m'' ganze Zahlen von 0 bis etwa 32 sind, q, q' und q'' unabhängig den Wert 0 oder 1 haben und m + q + m' + q' + m'' + q'' etwa 20 bis 40 ist (vorzugsweise zwischen 25 und 35).

**[0129]** Vorzugsweise ist der Rest Z ein Schwefelatom, d. h. die Linker sind Polyalkylenthioether; m = 5, Z = S, q = 1, m' = 12, Z' = S, q' = 1, m'' = 11, Z'' = CO und q'' = 1.

**[0130]** Eine weitere Klasse von geeigneten Linkern beinhaltet funktionalisierte Alkylketten mit endständigen Thiolgruppen, die eine zentrale Disulfidbindung bilden. Das Disulfid wirkt als hydrophober Drehpunkt im Zentrum der Membran. Diese Verbindungen haben die allgemeine Formel



in der der Rest X ein hydrophobes fluoreszierendes Anion, der Rest Y ein fluoreszierendes zweites Reagenz, das ein grün fluoreszierendes Protein, ein fluoreszierend markiertes Protein oder ein Coumarin umfasst, ist, n und n' ganze Zahlen von 0 bis etwa 32 sind, wobei n + n' weniger als oder gleich 33 ist.

**[0131]** Dem Fachmann ist klar, daß die Linker-Gruppen mit geeigneten substituierten oder funktionalisierten ersten und zweiten Fluorophoren mit herkömmlicher Kopplungschemie umgesetzt werden können. Darüber hinaus ist klar, daß die Linker-Gruppe an vielen verschiedenen Positionen mit einem Fluorophor verbunden werden kann. Wichtige Positionen (X) zur Verbindung des Linkers in beispielhaften Oxonol-Klassen sind in [Fig. 12](#) veranschaulicht.

#### IV. Meßverfahren

**[0132]** In einer Klasse von erfindungsgemäßen Ausführungsformen wird die Fluoreszenz des hydrophoben Ions auf einer Fläche der Membran durch einen Mechanismus gequenchet, der von FRET verschieden ist. FRET hat die Vorteile, daß er über große Entfernungen wirksam ist, was die erforderlichen Akzeptor-Konzentrationen auf ein Mindestmaß beschränkt, und daß er ein ratiometrisches Ausgangssignal bei zwei Emissionswellenlängen liefert. Wenn ein FRET auch über sehr große Entfernungen, die größer als die Membrandicke sind, wirksam ist, besteht die Möglichkeit, daß er nicht zwischen Akzeptoren auf gleichen und Akzeptoren auf gegenüberliegenden Seiten der Membran unterscheiden kann. Die anderen Quenching-Mechanismen besitzen eine wesentlich kürzere Reichweite und sollten keinesfalls über die Membrandicke wirksam sein.

**[0133]** Das/der zweite Fluorophor/Quencher kann sich auf jeder der intrazellulären oder extrazellulären Fläche befinden, solange es/er für die eine oder die andere Fläche spezifisch ist. In den hier beschriebenen speziellen Beispielen wurde aus Gründen der Zweckmäßigkeit die extrazelluläre Oberfläche als Ziel verwendet.

**[0134]** FRET oder das Fluoreszenz-Quenching wird am besten durch Ins-Verhältnis-Setzen der Emission nachgewiesen, das zwischen den zwei Populationen des mobilen Fluorophors, d. h. dem an die extrazelluläre und dem an die intrazelluläre Fläche der Membran gebundenen Fluorophor unterscheiden kann. Insbesondere stellt ein FRET, bei dem ein fluoreszierender Akzeptor eingesetzt wird, eine Änderung des Emissionsverhältnisses bereit, das für konfokale Lasermikroskopie und interne Korrekturen für Veränderungen bei der Beladung des Donors, der Zelldicke und -position (einschließlich Bewegungsartefakten) und der Anregungsintensität gut geeignet ist. Emissionsverhältnisse ändern sich gewöhnlich stärker als jedes der Emissionswellenlängensignale allein, da die Donor- und Akzeptoremissionen sich in entgegengesetzte Richtungen verändern sollten, die sich gegenseitig verstärken, wenn sie ins Verhältnis zueinander gesetzt werden. Wenn ein Ins-Verhältnis-Setzen der Emission nicht erwünscht oder möglich ist, kann jede der Wellenlängen immer noch allein verwendet werden oder es kann die Veränderung der Lebensdauer des angeregten Zustands des Donors kontrolliert werden.

**[0135]** Emissionsverhältnisse werden entweder durch Veränderung des Durchlaßbereichs eines Wellenlängen-selektiven Filters vor einem einzelnen Detektor oder vorzugsweise durch Aufspalten des emittierten Lichts mit einem dichroitischen Spiegel und gleichzeitigem Messen von zwei Wellenlängenbereichen mit zwei Detektoren gemessen, denen jeweils zusätzliche Wellenlängen-selektive Filter vorausgehen können. Im ersten Verfahren können die Wellenlängen-selektiven Filter zwei oder mehrere Interferenzfilter mit verschiedenen Durchlaßbereichen sein, die abwechselnd vor dem Detektor angeordnet werden, oder sie können ein kontinuierlich abstimmbarer Monochromator sein, der wiederholt über einen Wellenlängenbereich abgetastet wird. Der Vorteil des ersten Verfahrens besteht darin, daß nur ein Detektor verwendet wird, was Detektoren einspart und das Problem der genauen Anpassung zweier Detektoren vermeidet. Die Vorteile des zweiten Verfahrens, nämlich der Verwendung eines dichroitischen Spiegels und zwei getrennten Detektoren bestehen darin, daß die beiden Emissionen wirklich gleichzeitig anstatt nacheinander gemessen werden können und daß die von der Probe emittierten Photonen besser ausgenutzt werden.

**[0136]** Eine molekulare Spezifität für bestimmte Zelltypen in einer gemischten Population kann durch Verwendung zellspezifischer Antikörper oder Lektine als Träger der extrazellulären fluoreszierenden Markierung oder durch Verwendung eines grün fluoreszierenden Proteins eingeführt werden, das spezifisch in einem gegebenen Zelltyp als die intra- oder extrazelluläre Markierung exprimiert wird. Spezifisch markierte Zellen verringern auch die Hintergrundfärbung und gewährleisten starke Fluoreszenzänderungen in komplexen Geweben.

**[0137]** Eine hohe Empfindlichkeit wird erreicht, wenn der Spannungssensor (d. h. das hydrophobe Anion des ersten Reagenz) mindestens eine volle Einheitsladung nahezu über den ganzen Weg durch die Membran translociert. Sogar ohne spezifische Ionen-Kanäle oder -Transporter kann eine solche Translokation ziemlich schnell sein, wenn das Ion negativ geladen, delokalisiert und hydrophob ist. Beispielsweise erzeugt das Lipid-lösliche, nicht fluoreszierende Anion des Dipicrylamins (2,2',4,4',6,6'-Hexanitrodiphenylamin) Verschiebungsströme in anregbarem Gewebe mit Submillisekunden-Kinetiken, deren Geschwindigkeit mit Natrium-Kanal-Torströmen vergleichbar ist [R. Benz und F. Conti, 1981, Structure of the squid axon membrane as derived

from charge-pulse relaxation studies in the presence of absorbed lipophilic ions, J. Membrane Biol. 59, 91–104; R. Benz und W. Nonner, 1981, Structure of the axolemma of frog myelinated nerve: relaxation experiments with a lipophilic probe ion, J. Membrane Biol. 59, 127–134; J. M. Fernández, R. E. Taylor und F. Bezanilla, 1983, Induced capacitance in the squid giant axon, J. Gen. Physiol. 82, 331–346]. Das Abfühlen der Spannung sollte jedoch keine weitere Diffusion des Ions durch die unbewegten wässrigen Schichten erfordern, da dies die Antwort verlangsamt und einen anhaltenden Leckstrom verursacht.

**[0138]** Um ein optisches Signal der Translokation des fluoreszierenden hydrophoben Ions (d. h. des ersten Reagenz) von einer Seite der Plasmamembran zur anderen Seite zu erzeugen, wird FRET oder Fluoreszenz-Quenching zwischen dem translocierenden Ion und einem Fluorophor oder Quencher (d. h. dem zweiten Reagenz) verwendet, das an nur einer Fläche der Plasmamembran fixiert ist. Am zweckmäßigsten wird die extrazelluläre Fläche verwendet.

**[0139]** Als nicht beschränkendes Beispiel ist in **Fig. 1** schematisch der Fall gezeigt, bei dem translocierende Ionen anionische fluoreszierende Akzeptoren sind, die bei Wellenlängen absorbieren, die mit dem Emissionsspektrum der extrazellulär fixierten Donor-Fluorophore überlappen. Bei einem bestehenden negativen Membranpotential (A) weisen die permeablen Oxonole an der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran eine hohe Konzentration auf und der Energietransfer vom extrazellulär gebundenen FL-WGA (Fluorescein-Weizenkeim-Agglutinin) ist begünstigt. FRET wird durch den geraden Pfeil von Lektin zu Oxonol symbolisiert. Bei einem positiven Membranpotential (B) befinden sich die Anionen vorwiegend auf der intrazellulären Oberfläche der Membran und ein Energietransfer wird stark verringert, und zwar aufgrund ihres erhöhten mittleren Abstands von den Donoren auf der extrazellulären Oberfläche.

**[0140]** Die Geschwindigkeit der spannungsempfindlichen Fluoreszenzantwort hängt von der Translokationsgeschwindigkeit des Fluorophors von einer Seite zur anderen Seite ab. Die Geschwindigkeit der Antwort ist für DiSBA-C<sub>6</sub>(3) in **Fig. 5** gezeigt und folgt den allgemeinen Gleichungen (1) und (2). Wie diese Gleichung zeigt, werden fluoreszierende Ionen, die in einem Millisekunden-Zeitbereich als Antwort auf biologisch signifikante Veränderungen des Transmembranpotentials über die Membran springen, benötigt, um schnellen Polarisations-/Depolarisationskinetiken folgen zu können. Langsamer springende Ionen wären nicht geeignet, um beispielsweise schnellen elektrischen Signalen in neuronalem Gewebe zu folgen (eine Hauptanwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren). Die Entwicklung und Entdeckung solcher Moleküle mit der zusätzlichen Einschränkung, daß sie fluoreszierend sein müssen, ist keine triviale Aufgabe.

**[0141]** Die mobilen hydrophoben Anionen können vielmehr Donoren als Akzeptoren sein. Jede der Alternativen hat bestimmte Vorteile. Ein Beispiel, bei dem das hydrophobe Ion der FRET-Donor ist, ist die DiSBA-C<sub>6</sub>(3)/Texas-Rot-WGA-Kombination. Ein Hauptvorteil dieser Anordnung ist, daß sie die Konzentration des hydrophoben Farbstoff-Moleküls in der Membran auf ein Mindestmaß beschränkt; dies verringert die Toxizität und die zellulären Störungen, die sich aus dem Verschiebungsstrom und jeglichen photodynamischen Effekten ergeben. Ein weiterer Vorteil ist die im allgemeinen höhere Quantenausbeute von Fluorophoren, die in Membranen gebunden sind, im Verhältnis zu denen auf Proteinen oder in Wasser; dadurch wird bei einer gegebenen Entfernung ein besserer FRET erzeugt.

**[0142]** Es wurde hier gezeigt, daß Bis-(1,3-dialkyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonole, wobei Alkyl die n-Hexyl- und n-Decylgruppe bedeutet (DiSBA-C<sub>6</sub>(3) bzw. DiSBA-C<sub>10</sub>(3)) als Donoren für Texas-Rot-markiertes Weizenkeim-Agglutinin (TR-WGA) und als Akzeptoren von Fluorescein-markiertem Lektin (FL-WGA) wirken. In spannungsabgegriffenen Fibroblasten wurde die Translokation dieser Oxonole als Verschiebungsstrom mit einer Zeitkonstante von etwa 2 ms für 100 mV Depolarisation bei 20°C gemessen, was mit der Geschwindigkeit der Fluoreszenz-Änderungen übereinstimmt. Änderungen des Fluoreszenz-Verhältnisses zwischen 4 bis 34% wurden für eine 100 mV Depolarisation in Fibroblasten, Astrozytomzellen, schlagenden Herzmyozyten und B104-Neuroblastomzellen beobachtet. Die starken Fluoreszenz-Änderungen gestatteten eine Hochgeschwindigkeitskonfokal-Bilderzeugung.

**[0143]** In den Beispielen wurden einzelne Zellen verwendet, so daß die optischen Signale mit den Spannungsänderungen verglichen werden konnten, die von herkömmlichen Mikroelektroden-Techniken wie patch clamping, die nur auf einzelne Zellen anwendbar sind, genau bekannt sind. Es sollte jedoch klar sein, daß die Farbstoffe für viele Anwendungen eingesetzt werden können, in denen Mikroelektroden nicht einsetzbar sind. Der Vergleich mit Mikroelektroden wird lediglich für eine genaue Kalibrierung und den Beweis benötigt, daß der Mechanismus der Fluoreszenz-Signalerzeugung dem hier beschriebenen entspricht. Die hier beschriebenen Zwei-Reagenz-Zusammensetzungen und -Verfahren können entweder die verschiedenen elektrischen Potentiale vieler benachbarter Zellen oder benachbarter Teile einer einzelnen Zelle auflösen oder ein gemitteltes

Signal für alle Membran-Positionen ergeben, und zwar abhängig davon, ob das optische Signal räumlich dargestellt oder zusammengefaßt wird.

**[0144]** Die hier beschriebenen Verfahren sind auf viele Membranen anwendbar. Insbesondere können Membranpotentiale von Membranen biologischer Zellen nachgewiesen und kontrolliert werden. Das Verfahren ist am besten für Plasmamembranen geeignet, insbesondere die äußerste Plasmamembran von Säugerzellen. Nicht beschränkende Beispiele für Membranen sind subzelluläre Organellen, Membranen des endoplasmatischen Reticulums, sekretorische Granula, Mitochondrien, Mikrosomen und sekretorische Vesikel. Verwendbare Zelltypen sind unter anderem Neuronen, Herzzellen, Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten), Nervenzellen, Muskelzellen und dergleichen.

#### V. Arzneistoff-Screening

**[0145]** Die Erfindung stellt auch Verfahren zum Screenen von Testproben wie potentiellen therapeutischen Arzneistoffen, die Membranpotentiale in biologischen Zellen beeinflussen, bereit. Diese Verfahren beinhalten das vorstehend beschriebene Messen von Membranpotentialen in Gegenwart und Abwesenheit (Kontrollmessung) der Testprobe. Kontrollmessungen werden gewöhnlich mit einer Probe ausgeführt, die alle Komponenten der Testprobe enthält, jedoch nicht den vermuteten Arzneistoff. Der Nachweis einer Änderung des Membranpotentials in Gegenwart des Testmittels im Verhältnis zur Kontrolle zeigt, daß das Testmittel wirksam ist. Membranpotentiale können auch in Gegenwart oder Abwesenheit eines pharmakologischen Mittels bekannter Aktivität (d. h. einem Standardmittel) oder vermuteter Aktivität (d. h. einem Testmittel) bestimmt werden. Ein mit den hier beschriebenen Verfahren nachgewiesener Unterschied in den Membranpotentialen erlaubt den Vergleich der Wirkung des Testmittels mit der des Standardmittels. Es ist klar, daß viele Kombinationen und Permutationen von Arzneistoff-Screening-Protokollen bekannt sind. Diese bekannten Protokolle können unter Verwendung des hier beschriebenen Verfahrens der Membranpotential-Messung einfach angepaßt werden, um Verbindungen zu identifizieren, die Membranpotentiale beeinflussen. Die Verwendung der hier beschriebenen Technik zur Bestimmung von Membranpotentialen in Kombination mit all diesen Verfahren ist von dieser Erfindung umfaßt. In einer speziellen Anwendung stellt die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung bereit, die die Aktivität eines Ionenkanals, einer Ionenpumpe oder eines Ionenaustauschers in der Membran moduliert, umfassend:

- (a) Beladen der Zellen mit den ersten und zweiten Reagenzien, die zusammen das Membranpotential wie vorstehend beschrieben messen;
- (b) Bestimmen des Membranpotentials wie vorstehend beschrieben;
- (c) Aussetzen der Zellen gegenüber der Testprobe;
- (d) erneutes Bestimmen des Membranpotentials und Vergleichen mit dem Ergebnis von (b) zur Bestimmung der Wirkung der Testprobe;
- (e) gegebenenfalls Aussetzen der Membran gegenüber einem Reiz, der einen Ionenkanal, eine Ionenpumpe oder einen Ionenaustauscher moduliert, und erneutes Bestimmen des Membranpotentials und Vergleichen mit dem Ergebnis von (d) zur Bestimmung der Wirkung der Testprobe auf die Antwort auf den Reiz.

**[0146]** In einer weiteren Anwendung stellt die Erfindung ein Verfahren zum Screenen von Testproben bereit, und zwar zur Identifizierung einer Verbindung, die die Aktivität eines Ionenkanals, einer Ionenpumpe oder eines Ionenaustauschers in einer Membran moduliert, umfassend:

- (a) Beladen eines ersten und eines zweiten Satzes von Zellen mit ersten und zweiten Reagenzien, die zusammen das Membranpotential messen;
- (b) gegebenenfalls Aussetzen von sowohl dem ersten als auch dem zweiten Satz von Zellen gegenüber einem Reiz, der einen Ionenkanal, eine Ionenpumpe oder einen Ionenaustauscher moduliert;
- (c) Aussetzen des ersten Satzes von Zellen gegenüber der Testprobe;
- (d) Messen des Membranpotentials des ersten und zweiten Satzes von Zellen; und
- (e) In-Beziehung-Setzen der Membranpotential-Differenzen zwischen den ersten und zweiten Sätzen von Zellen zur Fähigkeit einer Verbindung in der Testprobe, die Aktivität eines Ionenkanals, einer Ionenpumpe oder eines Ionenaustauschers in einer Membran zu modulieren.

**[0147]** Interessierende Ionenkanäle beinhalten unter anderem Natrium-, Calcium-, Kalium-, nicht spezifische Kation- und Chlorid-Ionenkanäle, wobei jeder davon konstitutiv offen, spannungsgesteuert, Ligand-gesteuert oder durch intrazelluläre Signalwege gesteuert sein kann.

**[0148]** Biologische Zellen, die gescreent werden können, sind unter anderem Primärkulturen von Säugerzellen, von Säugergewebe dissoziierte Zellen, und zwar entweder unmittelbar oder nach Primärkultur. Zelltypen sind unter anderem weiße Blutzellen (z. B. Leukozyten), Hepatozyten, Pankreas-beta-Zellen, Neuronen, glatte

Muskelzellen, Darmepithelzellen, Herzmyozyten, Gliazellen und dergleichen. Die Erfindung beinhaltet auch die Verwendung rekombinanter Zellen, in die die Ionentransporter, Ionenkanäle, -pumpen und -austauscher eingesetzt und mittels Gentechnik exprimiert wurden. Viele cDNA-Sequenzen für solche Transporter wurden geklont (vgl. US-PS 5,380,836 für einen geklonten Natriumkanal) und Verfahren für deren Expression in interessierenden Zelllinien sind bekannt (vgl. US-PS 5,436,128). Beispiele für gezüchtete Zelllinien, die von Menschen oder anderen Säugern abgeleitet sind, beinhalten LM(TK<sup>-</sup>)-Zellen, HEK293 (Nierenzellen von menschlichen Embryonen), 3T3-Fibroblasten, COS-Zellen, CHO-Zellen, RAT1- und HLHepG2-Zellen.

**[0149]** Die hier beschriebenen Screening-Verfahren können auf Zellen angewandt werden, die in feste Oberflächen wachsen oder auf solchen Oberflächen abgelagert sind. Eine gebräuchliche Technik ist die Verwendung einer Mikrotiterplattenvertiefung, wobei die Fluoreszenz-Messungen mit käuflichen Fluoreszenzplatten-Lesegeräten durchgeführt werden. Die Erfindung beinhaltet High Throughput Screening (HTS) sowohl in automatischen als auch halbautomatischen Systemen. Ein solches Verfahren besteht darin, daß Zellen in Costar Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (flach mit einem durchsichtigen Boden) verwendet werden und daß das Fluoreszenzsignal mit einem CytoFluor Multiwell Plattenlesegerät (Perseptive Biosystems, Inc., MA) unter Verwendung von zwei Emissionswellenlängen zur Aufnahme von Fluoreszenz-Emissionsverhältnissen gemessen wird.

**[0150]** Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht beschränkend aufzufassen.

## BEISPIELE

### BEISPIEL I – SYNTHESE VON OXONOL-FARBSTOFFEN

**[0151]** Alle Ausgangsmaterialien und -reagenzien wiesen die höchste erhaltliche Reinheit auf (Aldrich, Milwaukee, WI) und wurden ohne weitere Reinigung verwendet, falls nichts anderes angegeben ist. Lösungsmittel waren HPLC-rein (Fisher) und wurden über aktiviertem Molekularsieb 3 Å getrocknet. Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian Gemini 200 MHz Spektrometer (Palo Alto, CA) aufgenommen. Die Spektren wurden auf den Lösungsmittel-Peak von CHCl<sub>3</sub> bei 7,24 ppm bezogen. Fluoreszenzspektren wurden mit einem Spex Fluorolog-2 (Edison, NJ) aufgenommen und wurden gegen Veränderungen der Lampen- und Detektor-Wellenlänge unter Verwendung der vom Hersteller gelieferten Korrekturdaten korrigiert.

**[0152]** Bis-(1,3-dibutyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonol DiSBA-C<sub>4</sub>-(3): DiSBA-C<sub>4</sub>-(3) wurde auf der Basis des für das Ethylderivat angegebenen Verfahrens hergestellt [GB-PS 1,231,884]. 1,3-Dibutyl-thiobarbiturat (500 mg, 2 mmol) wurde in 700 µl Pyridin gelöst und mit einem Gemisch von 181 µl (1,1 mmol) Malonaldehyd-bis-(dimethylacetal) und 100 µl einer 1 M HCl versetzt, worauf sich die Lösung sofort rot färbte. Nach 3 Stunden wurde die Hälfte des Reaktionsgemisches entfernt und 2 Äquivalente des geschützten Malonaldehyds wurden stündlich insgesamt 4 Stunden lang dem verbliebenen Gemisch zugesetzt. Danach wurden die ausgefallenen purpur-schwarzen Kristalle des DiSBA-C<sub>4</sub>-(3)-Pyridiniumsalzes abfiltriert. Nach dem Waschen der Kristalle mit Wasser und Trocknen unter vermindertem Druck (0,7 mbar (0,5 Torr)) wurden 67,2 mg reines Produkt erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 8,91 (2H, d, J = 5,1 Hz, py), 8,76 (1H, t, J = 13,7 Hz, mittleres Methin), 8,52 (1H, t, J = 8,0 Hz, py), 8,16 (2H, d, J = 13,9 Hz, Methin), 8,00 (2H, dd, J<sub>1</sub>~J<sub>2</sub> = 6,9 Hz, py), 4,47 (8H, cm, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,69 (8H, cm, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,39 (8H, cm, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,95 (12H, t, J = 6,4 Hz, Methyl).

**[0153]** Zur Herstellung von 1,3-Dibutyl-thiobarbiturat wurden 1,22 g Natrium (53 mmol) langsam unter Argon in 20 ml trockenem Ethanol gelöst. Die Ethanolatlösung wurde mit 8,5 g (8 ml, 53 mmol) Diethylmalonat und dann mit 5 g (26,5 mmol) Dibutylthioharnstoff versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat unter Zugabe von Wasser geklärt. Dann wurde bis zu einem pH-Wert von 1–2 konzentrierte HCl zugegeben, worauf das saure Filtrat 3× mit einem Hexangemisch extrahiert wurde. Nach dem Konzentrieren des Extrakts wurde ein Niederschlag von 5,5 g Rohprodukt erhalten. Der Feststoff wurde aus Methanol unter Zugabe von kleinen Mengen Wasser umkristallisiert, wobei 4,23 g der reinen Barbitursäure erhalten wurden. (Ausbeute: 65%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 4,33 (4H, cm, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,71 (2H, s, Ring-CH<sub>2</sub>), 1,63 (4H, cm, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,35 (4H, cm, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,94 (6H, t, J = 6,2 Hz, Methyl).

**[0154]** Bis-(1,3-dihexyl-2-thiobarbiturat)-pentamethinoxonol (DiSBA-C<sub>6</sub>-(5)): 1,3-Dihexyl-2-thiobarbitursäure (200 mg, 0,64 mmol) und Glutakondialdehyddianilmonohydrochlorid (Chemical Abstract Name: N-[5-(Phenylamino)-2,4-pentadienyliden]-phenylamin, Monohydrochlorid) (91 mg, 0,32 mmol) wurden in 1 ml Pyridin gemischt, worauf sich die Lösung innerhalb von 10 Sekunden blau färbte. Das Reaktionsgemisch wurde 1,5 Stunden gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in

$\text{CHCl}_3$  gelöst und einer Kieselgel-Chromatographie mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (93:7) als Eluent unterworfen, wobei reines blaues Oxonol (72 mg) gewonnen wurde.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ): 7,60-7,80 (4H, cm, Methin- $\text{CH}_2$ ), 7,35 (1H, t,  $J = 11,3$  Hz, mittleres Methin), 4,31 (8H, cm,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 1,57 (8H, cm,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{R}$ ), 1,20 (24H, breites m, bulk  $\text{CH}_2$ ), 0,74 (12H, breites t, Methyl).

**[0155]** Weitere Oxonole wurden mit dem gleichen Verfahren unter Verwendung des geeigneten Thioharnstoffs hergestellt, der aus dem erforderlichen primären Amin und Kohlenstoffdisulfid synthetisiert wurde [N. Bortnick, L. S. Luskin, M. D. Hurwitz und A. W. Rytina, 1956, t-Carbinamines,  $\text{RR}'\text{R}''\text{CNH}_2$ , III.. The preparation of isocyanates, isothiocyanates and related compounds, J. Am. Chem. Soc. 78, 4358–4361]. Eine beispielhafte Synthese von DiSBA- $\text{C}_6$ -(3) ist in [Fig. 13](#) abgebildet.

## BEISPIEL II – SYNTHESE VON FLUORESZIERENDEN PHOSPHOLIPIDEN

**[0156]** Cou-PE: 3-Amidoglycin-6-chlor-7-butyryloxy-cumarin wurde nach der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/407,554, eingereicht am 20. März 1995, wie nachstehend angegeben hergestellt. Zur Synthese von 2,4-Dihydroxy-5-chlor-benzaldehyd wurden 21,7 g (0,15 Mol) 4-Chlorresorcin in 150 ml trockenem Diethylether gelöst und unter Rühren mit 27 g feingepulvertem Zink(II)-cyanid und 0,5 g Kaliumchlorid versetzt. Die Suspension wurde im Eisbad gekühlt und anschließend wurde unter heftigem Rühren ein starker Chlorwasserstoff-Gasstrom in die Lösung eingeleitet. Nach etwa 30 Minuten waren die Reaktanten gelöst. Die Zugabe von Chlorwasserstoff wurde solange fortgesetzt, bis die Absorption in der Etherlösung endete (etwa 1 Stunde). Während dieser Zeit bildete sich ein Niederschlag. Die Suspension wurde 1 weitere Stunde im Eisbad gerührt, worauf man den Feststoff absetzen ließ. Die Etherlösung wurde vom Feststoff abdekantiert, der dann mit 100 g Eis behandelt und in einem Wasserbad auf  $100^\circ\text{C}$  erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen kristallisierte das Produkt in glänzenden Plättchen aus, die abfiltriert und über Kaliumhydroxid getrocknet wurden. Die Ausbeute betrug 15,9 g (0,092 Mol, 61%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6,23 ppm (s, 1H, Phenol),  $\delta$  6,62 ppm (s, 1H, Phenyl),  $\delta$  7,52 ppm (s, 1H, Phenyl),  $\delta$  9,69 ppm (s, 1H, Formyl),  $\delta$  11,25 ppm (s, 1H, Phenol).

**[0157]** Zur Herstellung von 3-Carboxy-6-chlor-7-hydroxycumarin wurden 5,76 g (0,033 Mol) 2,4-Dihydroxy-5-chlorbenzaldehyd und 7,2 g (0,069 Mol) Malonsäure in 5 ml warmem Pyridin gelöst und unter Rühren mit 75  $\mu\text{l}$  Anilin versetzt, worauf man das Reaktionsgemisch 3 Tage bei Raumtemperatur stehenließ. Der gebildete gelbe Feststoff wurde in kleinere Stücke gebrochen und mit 50 ml Ethanol versetzt. Die cremige Suspension wurde durch eine Glasfritte filtriert und der Feststoff wurde 3 $\times$  mit 1 N Chlorwasserstoffsäure und dann mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff mit 100 ml Ethylacetat, 150 ml Ethanol und 10 ml halbkonzentrierter Chlorwasserstoffsäure gerührt. Das Lösungsmittel-Volumen wurde unter vermindertem Druck verringert, der Niederschlag abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet, wobei 4,97 g (0,021 Mol, 63%) Produkt in Form eines weißen Pulvers erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{dDMSO}$ ):  $\delta$  6,95 ppm (s, 1H),  $\delta$  8,02 ppm (s, 1H),  $\delta$  8,67 ppm (s, 1H).

**[0158]** Zur Herstellung von 7-Butyryloxy-3-carboxy-6-chlorcumarin wurden 3,1 g (12,9 mmol) 3-Carboxy-6-chlor-7-hydroxycumarin in 100 ml Dioxan gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 5 ml Buttersäureanhydrid, 8 ml Pyridin und 20 mg Dimethylaminopyridin behandelt. Die Reaktionslösung wurde unter Rühren in 300 ml Heptan gegossen, worauf sich ein weißer Niederschlag bildete, der durch Filtration abgetrennt und in 150 ml Ethylacetat gelöst wurde. Ungelöstes Material wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat 2 $\times$  mit 50 ml 1 N Chlorwasserstoffsäure/Salzlösung (1:1) und anschließend mit Salzlösung extrahiert. Die Lösung wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Verdampfen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck ergab 2,63 g (8,47 mmol, 66%) Produkt.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,08 ppm (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, Buttersäure-Methyl),  $\delta$  1,85 ppm (m, 2H,  $J_1\sim J_2 = 7,4$  Hz, Buttersäure-Methylen),  $\delta$  2,68 ppm (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, Buttersäure-Methylen),  $\delta$  7,37 ppm (s, 1H, Cumarin),  $\delta$  7,84 ppm (s, 1H, Cumarin),  $\delta$  8,86 ppm (s, 1H, Cumarin).

**[0159]** Zur Herstellung von 7-Butyryloxy-3-benzyloxycarbonylmethylaminocarbonyl-6-chlorcumarin wurden 2,5 g (8,06 mmol) 7-Butyryloxy-3-carboxy-6-chlorcumarin, 2,36 g Hydroxybenzotriazolhydrat (16 mmol) und 1,67 g (8,1 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 30 ml Dioxan gelöst. Eine Toluollösung von O-Benzylglycin [hergestellt durch Extraktion von 3,4 g (10 mmol) Benzylglycintosylsalz mit Ethylacetat/Toluol/gesättigte wässrige Hydrogencarbonatlösung/Wasser (1:1:1:1, 250 ml), Trocknen der organischen Phase mit wasserfreiem Natriumsulfat und Verminderung des Lösungsvolumens auf 5 ml] wurde tropfenweise der Cumarinlösung zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gehalten, worauf der gebildete Niederschlag abfiltriert und gründlich mit Ethylacetat und Aceton gewaschen wurde. Die vereinigten Lösungsmittelfractionen wurden am Rotationsverdampfer auf 50 ml konzentriert, worauf 1 Volumenteil Toluol zugesetzt und das Volu-

men weiter auf 30 ml verringert wurde. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert und in 200 ml Chloroform/Ethanol abs. (1:1) gelöst. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf 50 ml konzentriert und das Produkt abfiltriert und unter vermindertem Druck getrocknet, wobei 1,29 g der Titelverbindung erhalten wurden. Eine weitere Verringerung des Lösungsmittelvolumens ergab eine zweite Ausbeute von 0,64 g. Gesamtausbeute: 1,93 g (4,22 mmol, 52%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1,08 ppm (t, 3H, J = 7,4 Hz, Buttersäure-Methyl), δ 1,84 ppm (m, 2H, J<sub>1</sub>~J<sub>2</sub> = 7,4 Hz, Buttersäure-Methylen), δ 2,66 ppm (t, 2H, J = 7,4 Hz, Buttersäure-Methylen), δ 4,29 ppm (d, 2H, J = 5,5 Hz, Glycinmethylen), δ 5,24 ppm (s, 2H, Benzyl), δ 7,36 ppm (s, 1H, Cumarin), δ 7,38 ppm (s, 5H, Phenyl), δ 7,77 ppm (s, 1H, Cumarin), δ 8,83 ppm (s, 1H, Cumarin), δ 9,15 ppm (t, 1H, J = 5,5 Hz, Amid).

**[0160]** Zur Herstellung von 7-Butyryloxy-3-carboxymethylaminocarbonyl-6-chlorcumarin wurden 920 mg (2 mmol) 7-Butyryloxy-3-benzyloxycarbonylmethylaminocarbonyl-6-chlorcumarin in 50 ml Dioxan gelöst und mit 100 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) und 100 µl Essigsäure versetzt, worauf die Suspension bei Normaldruck unter Wasserstoffatmosphäre heftig gerührt wurde. Nachdem die Aufnahme von Wasserstoff beendet war, wurde die Suspension filtriert. Das Kohlenstoff-enthaltende Produkt wurde fünfmal mit 25 ml siedendem Dioxan extrahiert. Man ließ die vereinigten Dioxanlösungen abkühlen, worauf das Produkt als weißes Pulver ausfiel. Nach dem Einengen der Lösung auf 20 ml konnte weiteres Produkt gewonnen werden. Die verbleibende Dioxanlösung wurde zum Sieden erhitzt und solange mit Heptan versetzt, bis eine Trübung eintrat. Die getrockneten Pulver wogen 245 mg, 389 mg und 58 mg. Insgesamt wurden 692 mg (1,88 mmol, 94%) weißes Produkt erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (dDMSO): δ 1,02 ppm (t, 3H, J = 7,4 Hz, Buttersäure-Methyl), δ 1,73 ppm (m, 2H, J<sub>1</sub>~J<sub>2</sub> = 7,3 Hz, Buttersäure-Methylen), δ 2,70 ppm (t, 2H, J = 7,2 Hz, Buttersäure-Methylen), δ 4,07 ppm (d, 2H, J = 5,6 Hz, Glycin-Methylen), δ 7,67 ppm (s, 1H, Cumarin), δ 8,35 ppm (s, 1H, Cumarin), δ 8,90 ppm (s, 1H, Cumarin), δ 9,00 ppm (t, 1H, J = 5,6 Hz, Amid).

**[0161]** 6-Chlor-7-(n-butyryloxy)-cumarin-3-carboxamidoessigsäure (26,2 mg, 100 µmol) wurde in 2 ml 1:1 CHCl<sub>3</sub>/Dioxan gelöst und unter Argon bei 4°C mit Isobutylchlorformiat (14,3 ml, 110 µmol) versetzt und 30 Minuten gerührt. Getrennt davon wurde Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE) (20 mg, 31,5 µmol) in 1 ml CHCl<sub>3</sub> gelöst und mit 1 Tropfen trockenem Methanol und 6 ml (34,5 µmol) Diisopropylethylamin (DIEA) versetzt. Die Lösung des gemischten Anhydrids wurde dann in die Phospholipidlösung pipettiert. Nach 2 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 3 ml MeOH gelöst und mit 3 ml 0,25 M NaHCO<sub>3</sub> gemischt. Die Lösung färbte sich nahezu sofort gelb und wurde 15 Minuten gerührt. Die Lösung wurde dann 3–5× mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert, worauf sich eine Emulsion bildete. Die Extrakte wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde in 1 ml 1:1 MeOH/H<sub>2</sub>O gelöst und auf einer C<sub>18</sub>-RP-Säule (1,7 × 7 cm) gereinigt. Bei Elution mit dem gleichen Lösungsmittel passierte eine fluoreszierende Bande die Säule, gefolgt von einer langsameren Bande. Die Lösungsmittelpolarität wurde auf 9:1 MeOH/H<sub>2</sub>O erniedrigt, worauf die gelbe Hauptbande von der Säule eluiert wurde. Nach dem Konzentrieren und Trocknen wurden 2,5 mg (2,74 µmol) des reinen Produkts gesammelt.

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD): d 8,72 (s, 1H, Cumarin), 7,81 (s, 1H, Cumarin), 6,84 (s, 1H, Cumarin), 5,25 (cm, 2H), 4,43 (dd, J<sub>1</sub> = 12,1 Hz, J<sub>2</sub> = 3,2 Hz), 4,22 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 4,13 (s, ~4H), 3,7–4,1 (cm, ~11H), 3,47 (cm, ~3H), 3,2–3,3 (~q), 2,31 (cm, ~7H), 1,57 (breites s, ~8H, CH<sub>2</sub>, benachbart zur Carbonylgruppe), 1,2–1,5 (cm, ~63H, bulk CH<sub>2</sub>), 0,92 (nicht aufgelöstes t, ~12H, CH<sub>3</sub>). Elektrospray-MS (neg. Ion) [MeOH/H<sub>2</sub>O: 95/5] (Peak, rel. Int.) 456,8 (M<sup>-2</sup>, 20), 524,5 (50), 704,9 (6), 734,7 (100), 913,9 (M<sup>-1</sup>, 95), dekonvolutierte M = 915,3 amu, berechnet: M = 915,5 amu. UV-Vis (MeOH/HBSS, 2/1) λ<sub>max</sub> = 414 nm, Fluoreszenz (MeOH/HBSS, 2/1) λ<sub>emax</sub> = 450 nm, Quantenausbeute = 1,0.

**[0162]** Cy5-PE: DMPE (1,0 mg, 1,6 µmol) wurde in 650 ml (12:1) CHCl<sub>3</sub>/MeOH gelöst und mit DIEA (1 ml, 5,7 µmol) versetzt. Getrennt davon wurde Cy5-OSu (Amersham, Arlington Heights, IL), der N-Hydroxysuccinimidester von N-Ethyl-N'-(5-carboxypentyl)-5,5'-disulfoindodicarbocyanin (0,8 mg, 1 µmol) in 150 ml (2:1) CHCl<sub>3</sub>/MeOH gelöst und der Phospholipidlösung zugesetzt. Nach 3 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst und auf eine C<sub>18</sub>-RP-Säule (1 × 10 cm), die mit 1:1 MeOH/H<sub>2</sub>O equilibriert war, aufgegeben. Bei Elution mit dem gleichen Lösungsmittel wurde der hydrolysierte Ester entfernt. Die Polarität wurde auf 9:1 MeOH/H<sub>2</sub>O verringert und das reine blaue Produkt wurde von der Säule eluiert, wobei 400 mg (310 µmol, 31%) erhalten wurden.

### BEISPIEL III – SYNTHESE EINES LINKERS FÜR DONOREN UND AKZEPTOREN

**[0163]** Dieses Beispiel bezieht sich auf die [Fig. 14–Fig. 16](#). 12-p-Methoxybenzylthio-1-dodecanol (1): Na (800 mg, 34,8 mmol) wurde in 30 ml trockenem Methanol gelöst und die Lösung wurde unter Argon mit p-Methoxybenzylmercaptan (2,75 ml, 3,04 g, 19,7 mmol) versetzt. Nach wenigen Minuten wurde dem Reaktionsgemisch

12-Bromdodecanol (2,5 g, 9,43 mmol) tropfenweise zugesetzt. Innerhalb 5 Minuten bildete sich ein Niederschlag. Nach wenigstens 3 Stunden wurde das Reaktionsgemisch filtriert und dreimal mit kaltem Methanol gewaschen, wobei nach dem Trocknen 2,874 g (8,49 mmol, 90%) reines Produkt erhalten wurden.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,23 (d, J = 8,8 Hz, 2H, AA' des aromatischen AA' BB' Systems), 6,85 (d, J = 8,8 Hz, 2H, BB' des aromatischen AA' BB' Systems), 3,80 (s, 3H, Methoxy), 3,66 (s, 2H, Benzyl), 3,64 (dt, J<sub>1</sub> = 6,6 Hz, J<sub>2</sub> = 5,5 Hz, 2H, RCH<sub>2</sub>OH), 2,40 (t, J = 7,3 Hz, 2H, RSCH<sub>2</sub>R), 1,50-1,65 (cm, 4H, CH<sub>2</sub> an Heteroatomen), 1,2-1,4 (cm, 16H, bulk Methylengruppen).

**[0164]** 12-p-Methoxybenzylthio-1-bromdodecan (2): (1) (500 mg, 1,48 mmol) wurde mit Kohlenstofftetrabromid (611 mg, 1,85 mmol) in 2,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gemischt und in einem Eisbad gekühlt, bis sich ein Niederschlag bildete. Nach dem Entfernen des Eisbads wurde das Reaktionsgemisch mit Triphenylphosphin (348 mg, 2,22 mmol) versetzt, worauf sich die Lösung sofort gelblich färbte. Laut DC (EtOAc/Hexan, 1:1) war das Ausgangsmaterial nach 30 Minuten verbraucht. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der feste Rückstand mit 50 ml Hexan versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde die Lösung filtriert und nach Konzentrierung wurde ein Feststoff erhalten, der mit etwa 10–15 ml Hexan gemischt und erneut filtriert wurde. Nach dem Trocknen ergab das konzentrierte Filtrat 537 mg (1,34 mmol, 91%) reines Produkt.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7,23 (d, J = 8,6 Hz, 2H, AA' des aromatischen AA' BB' Systems), 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H, BB' des aromatischen AA' BB' Systems), 3,80 (s, 3H, Methoxy), 3,67 (s, 2H, Benzyl), 3,41 (t, J = 6,9 Hz, 2H, RCH<sub>2</sub>Br), 2,40 (t, J = 7,3 Hz, 2H, RSCH<sub>2</sub>R), 1,86 (cm, 2H, CH<sub>2</sub> an Br), 1,15-1,45 (cm, 18H, bulk Methylengruppen).

**[0165]** 12-(12-p-Methoxybenzylthio-1-dodecylthio)-dodecansäure (3): Eine Lösung von Natrium (116 mg, 5 mmol) in trockenem MeOH wurde mit 12-Mercapto-1-dodecansäure (340 mg, 1,46 mmol) – hergestellt gemäß JACS 115, 3458–3474, 1993 – versetzt. Nach fünfminütigem Rühren unter schwachem Erwärmen wurde (2) (497 mg, 1,24 mmol) dem Reaktionsgemisch zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde sehr viskos und es wurden weitere 1,75 ml MeOH zugesetzt, worauf man das Reaktionsgemisch über Nacht stehenließ. Die Umsetzung wurde mit 10%iger Essigsäure abgebrochen. Das pastenartige Reaktionsgemisch wurde in einen 500 ml Scheidetrichter überführt und in gleichen Volumina von EtOAc/Hexan (1:1) und der Essigsäurelösung gelöst. Die organische Schicht wurde abgetrennt und die wässrige Schicht anschließend zwei weitere Male extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden konzentriert, wobei 740,3 mg (1,34 mmol) Rohprodukt erhalten wurden. Die überschüssige Essigsäure wurde als Toluolazeotrop entfernt. Der Feststoff wurde aus Isopropylether kristallisiert, wobei 483 mg (71%) erhalten wurden. DC und NMR zeigten eine Verunreinigung, die wahrscheinlich ein Disulfid-Nebenprodukt ist. Das Material wurde durch Flash-Chromatographie (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AA (99:0,5:0,5)) weiter gereinigt, wobei 334 mg (0,604 mmol, 49%) reines Produkt erhalten wurden.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 9,45 (breites s, 1H, COOH), 7,23 (d, J = 8,8 Hz, 2H, AA' des aromatischen AA' BB' Systems), 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H, BB' des aromatischen AA' BB' Systems), 3,80 (s, 3H, Methoxy), 3,66 (s, 2H, Benzyl), 2,50 (t, J = 7,3 Hz, 4H, RCH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>R), 2,40 (t, J = 7,3 Hz, 2H, RSCH<sub>2</sub>R), 2,35 (t, J = 7,5 Hz, 2H, RCH<sub>2</sub>COOH), 1,5-1,7 (cm, 8H, CH<sub>2</sub> an Heteroatomen), 1,15-1,45 (cm, 30H, bulk Methylengruppen).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 179,5 (COOH), 129,9 (aromatisch, 2C), 113,9 (aromatisch, 2C), 55,2 (MeOR), 35,6 (CH<sub>2</sub>), 33,7 (CH<sub>2</sub>), 32,2 (CH<sub>2</sub>), 31,3 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>), 29,2 (CH<sub>2</sub>), 28,9 (CH<sub>2</sub>), 24,6 (CH<sub>2</sub>).

**[0166]** 1-Butyl-3-(12-(12-pentylthio-1-dodecylthio)-dodecansäure)-thiobarbiturat (13): (3) (73,8 mg, 133,5 μmol) wurde bei 70°C 2,5 Stunden in 2 ml trockenem TFA/Anisol (14:1) entschützt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 ml trockenem EtOH gelöst. Natriumborhydrid (330 mg) wurde zugesetzt und das Gemisch über Nacht gerührt. Die Lösung wurde dann mit konzentrierter HCl angesäuert, bis die Gasentwicklung endete. Die Lösung wurde dann viermal mit Ether extrahiert und die vereinigten Extrakte wurden konzentriert, wobei ein weißer Feststoff zurückblieb. Der Feststoff wurde anschließend gelöst und zweimal mit entgastem MeOH konzentriert. Nach dem Trocknen unter Hochvakuum wurden 69,5 mg Feststoff erhalten. Eine Abschätzung per DC ergab, daß dieser Feststoff aus gleichen Teilen entschütztem Produkt und Di-p-methoxyphenylmethan (104 μmol, 78%) bestand. Der entschützte Linker wurde unter Erhitzen in 0,5 ml trockenem DMF gelöst und die Lösung wurde mit NaH (~550 μmol) versetzt, wobei eine geringe Gasentwicklung auftrat. (8) (38,5 mg, ~100 μmol) wurden dann dem Reaktionsgemisch in 100 μl DMF zugesetzt, und man ließ das Reaktionsgemisch über Nacht bei 60°C stehen. Ein DC in EtOAc/MeOH/AA (90:8:2) zeigte, daß sich eine neue, weniger polare Barbitursäure gebildet hatte. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in EtOAc/Hexan (1:1) gelöst und mit Wasser gewaschen. Das Material wurde dann mittels Chromatographie (EtOAc/MeOH/AA (90:8:2)) gereinigt. Ein NMR des Produkts zeigte Signale der Barbitursäure und des Linkers. Elektrospray-MS (neg. Ion) [MeOH/H<sub>2</sub>O: 95/5] (Peak, rel. Int.) 516,4 (95), 699,4 (M<sup>-1</sup>, 100), 715,1 (M<sup>-1</sup> + 16, 40), 1024,0 (M<sup>-1</sup> + 32, 25), berechnet: M<sup>-1</sup> = 700,1 amu. Die Etherlinker wurden anscheinend teilweise zu Sulfoxiden oxidiert.

**[0167]** 1-(1,3-Dibutylthiobarbiturat)-3-(1-butyl-3-(12-(12-pentylthio-1-dodecylthio)-dodecansäure)-thiobarbiturat)-trimethinoxonol (14): (3) (73,8 mg, 133,5  $\mu\text{mol}$ ) wurde bei 70°C 2,5 Stunden lang in 2 ml trockenem TFA/Anisol (14:1) entschützt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 20 ml trockenem EtOH gelöst. Natriumborhydrid (330 mg) wurde zugegeben und das Gemisch über Nacht gerührt. Die Lösung wurde dann mit konzentrierter HCl angesäuert, bis die Gasentwicklung endete. Die Lösung wurde dann viermal mit Ether extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden konzentriert, wobei ein weißer Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde dann gelöst und zweimal mit entgastem MeOH konzentriert. Nach dem Trocknen unter Hochvakuum wurden 71,1 mg Feststoff erhalten. Per DC wurde abgeschätzt, daß dieser Feststoff zu gleichen Teilen aus dem entschützten Produkt und Di-p-methoxyphenylmethan (106  $\mu\text{mol}$ , 79%) bestand. Der entschützte Linker wurde unter Erhitzen in 1 ml trockenem DMF gelöst und mit NaH (~350  $\mu\text{mol}$ ) versetzt, worauf eine schwache Gasentwicklung auftrat. (12) (35,5  $\mu\text{mol}$ ) wurde dann dem Reaktionsgemisch in 200  $\mu\text{l}$  DMF zugesetzt. Die Umsetzung schien nach etwa 1 Stunde nicht mehr weiterzulaufen, so daß 4 mg N. H. (60%) dem Reaktionsgemisch zugesetzt wurden. Die Lösung wurde nun orange anstelle von rot und es bildete sich ein zweites unpolares Oxonol. Man ließ die Umsetzung bei 60°C weitere 18 Stunden laufen. Die Hälfte des Reaktionsgemisches wurde wie nachstehend beschrieben aufgearbeitet. Das Reaktionsgemisch wurde zusammen mit ~12 ml Toluol in einen 30 ml Scheidetrichter überführt, worauf 4 ml einer 10%igen Essigsäurelösung und 3 ml Wasser zugesetzt wurden. Der größte Teil des Oxonols löste sich in der organischen Phase, die dreimal mit Essigsäurelösung/Wasser (1:1) gewaschen wurde. Die organische Phase wurde dann konzentriert und mittels Flash-Chromatographie (2,5  $\times$  18 cm) gereinigt. Die Säule wurde gefüllt und es wurde zunächst mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AA}$  (93:5:2) eluiert. Nach Entfernung eines unpolaren Oxonols wurde die Polarität des Lösungsmittels auf  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AA}$  (90:8:2) erhöht, wodurch das Oxonolprodukt von der Säule gewaschen wurde. Nach Konzentrieren der Fraktionen und Trocknen wurden 7,2 mg (7,25  $\mu\text{mol}$ , 20%) reines Produkt erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR ( $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}$ ): d 8,54 (t, J = 13,8 Hz, 1H, mittleres Methin), 7,97 (d, J = 14,2 Hz, 2H, Methine), 4,39 (cm, 8H,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 2,46 (t, J = 7,3 Hz, 8H,  $\text{RCH}_2\text{SCH}_2\text{R}$ ), 2,2 (t, 2H,  $\text{RCH}_2\text{COOH}$ ), 1,5-1,8 (bulk Methylengruppen), 1,2-1,4 (bulk Methylengruppen), 0,92 (t, J = 7,2 Hz, 9H, Methylgruppen). Elektrospray-MS (neg. Ion) [ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ : 95/5] (Peak, rel. Int.) 683 (50), 977,8 (30), 992,1 ( $\text{M}^{-1}$ , 100), 1008,1 ( $\text{M}^{-1} + 16$ , 40), 1024,0 ( $\text{M}^{-1} + 32$ , 10), berechnet:  $\text{M}^{-1} = 992,5$  amu. Die +16- und +32-Peaks lassen eine Oxidation der Thioether zu Sulfoxidgruppen vermuten. (14) wurde auch analog der Synthese von (11) erfolgreich aus (13) unter Verwendung von (10) erhalten.

**[0168]** 1-(1,3-Dibutylthiobarbiturat)-3-(1-butyl-3-(12-(12-pentylthio-1-dodecylthio)-N-hydroxysuccinimid-dodecanoat)-thiobarbiturat)-trimethinoxonol (15): 22,5  $\mu\text{mol}$  (14) wurden mit Disuccinimidylcarbonat (57 mg, 225  $\mu\text{mol}$ ) in 0,5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in Gegenwart von DIEA (39  $\mu\text{l}$ , 225  $\mu\text{mol}$ ) umgesetzt. Ein DC ( $\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ ) (9:1) zeigte nach 1,5 Stunden, daß sich drei neue unpolare Banden gebildet hatten. Das Lösungsmittel wurde entfernt und die zwei unpolaren Oxonolbanden mittels Flash-Chromatographie ( $\text{EtOAc}/\text{MeOH}$ ) (95:5) gereinigt. Elektrospray-MS (neg. Ion) [ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ : 95/5] (Peak, rel. Int.) 1089,3 ( $\text{M}^{-1}$ , 20), 1105,1 ( $\text{M}^{-1} + 16$ , 100), 1121,0 ( $\text{M}^{-1} + 32$ , 60), berechnet:  $\text{M}^{-1} = 1089,5$  amu.

#### BEISPIEL IV – MESSUNG DES MEMBRANPOTENTIALS MIT OXONOL-FARBSTOFFEN ALS FRET-AKZEPTOREN UND FLUORESZIERENDEN LEKTINEN ALS FRET-DONOREN

**[0169]** FL-WGA wurde von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) erhalten. TR-WGA wurde aus WGA und Texas-Rot (Molecular Probes, Eugene, OR) in einem 100 mM Bicin-Puffer bei pH 8,5 hergestellt. Eine 73  $\mu\text{M}$  Lösung von WGA wurde mit einem 6fachen Überschuß Texas-Rot 1 Stunde bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Protein-Konjugat wurde auf einer G25 Sephadex-Säule gereinigt.

**[0170]** Alle Zellen wurden gezüchtet und behandelt wie L-M(TK<sup>-</sup>), falls nichts anderes angegeben ist. L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (Gibco, Grand Island, NY) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin-Streptomycin (PS) (Gemini, Calabasas, CA) gezüchtet. B104-Zellen wurden 5 Tage vor der Verwendung mit 1  $\mu\text{M}$  Retinsäure differenziert. Die Zellen wurden mindestens 1 Tag vor der Verwendung auf Deckgläsern ausplattiert. Die aneinander haftenden Zellen wurden gewaschen und in 2,5–3,0 ml HBSS mit 1 g/l Glukose und 20 mM HEPES bei pH 7,4 aufbewahrt. Eine frisch hergestellte 75  $\mu\text{M}$  wäßrige Lösung des geeigneten Oxonols wurde vor einem Experiment aus einer DMSO-Vorratslösung hergestellt. Die Zellen wurden durch Mischen von 100  $\mu\text{l}$  der Oxonollösung mit 750  $\mu\text{l}$  des Bades und anschließender Zugabe der verdünnten Lösung zu den Zellen gefärbt. Der Farbstoff wurde 30–40 Minuten bei einer Badkonzentration von 2,3  $\mu\text{M}$  belassen. 1,5 mM  $\beta$ -Cyclodextrin in der Badlösung war für ein Beladen der Zellen mit DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) nötig. Die Butyl- und Ethylderivate waren ausreichend wasserlöslich, um Zellen ohne  $\beta$ -Cyclodextrin-Komplexierung zu beladen. DiSBA-C<sub>10</sub>-(3) wurde in einer Lösung mit einem pH-Wert von 7,4, die 290 mM Sucrose und 10 mM HEPES, 364 mOsm enthielt, 10 Minuten bei einer Badkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  beladen. Das Markieren

mit DiSBA-C<sub>10</sub>-(3) wurde durch Ersetzen des Bades durch HBSS-Lösung abgebrochen. Die Zellen wurden 15 Minuten mit 15 µg/ml FL-WGA gefärbt. Für die B104-Zellen war eine Badkonzentration von 125 µg/ml erforderlich, um eine ausreichende Färbung mit dem Lektin zu erreichen. Die überschüssigen Farbstoffe wurden mit wiederholtem Waschen mit HBSS entfernt. Wenn die überschüssigen Ethyl- oder Butyloxonolderivate im Bad belassen wurden, wurden langsame Ströme und Fluoreszenzänderungen aufgrund einer Umverteilung der Farbstoffe in die Zelle während Depolarisationen mit einer Dauer von mehr als 1 Sekunde beobachtet. Die Herzmyozyten [S. A. Henderson, M. Spencer, A. Sen, C. Kumar, M. A. Q. Siddiqui und K. R. Chien, 1989, Structure organization and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene, *J. Biol. chem.* 264, 18142–18146] wurden uns von Prof. Kenneth Chien, UCSD; überlassen. Die Jurkat-Lymphozytensuspensionen wurden in RPMI-Medien mit 5% hitzeinaktiviertem FVBS und 1% PS gezüchtet. 15–20 ml Aliquots der zellulären Suspension wurden dreimal vor und nach der Farbstoffbehandlung durch vierminütige Zentrifugation bei 100 g und nachfolgenden Zugaben von frischem HBSS gewaschen.

**[0171]** Die fluoreszierend markierten Zellen wurden mit Licht einer 75 Watt Xenon-Lampe, das durch 450–490 nm Anregungs-Interferenzfilter geschickt wurde, angeregt. Das Licht wurde mittels eines 505 nm dichroitischen Spiegels auf die Probe reflektiert. Das emittierte Licht wurde mit einer 63 X Zeiss-Linse (1,25 oder 1,4 numerische Apertur) gesammelt, durch einen 505 nm Langwellen-Durchlaßfilter geschickt und auf einen G-1B 550 nm dichroitischen Spiegel (Omega, Brattleboro, VT) gerichtet. Das von diesem zweiten dichroitischen Spiegel reflektierte Licht wurde durch einen 515 DF35-Durchlaßbereichfilter geschickt und stellte das FL-WGA-Signal dar. Das übertragene Licht wurde durch einen 560 oder 570 LP-Filter geschickt und umfaßte das Oxonol-Signal. Für Experimente, bei denen Oxonol als Donor für TR-WGA verwendet wurde, wurde der 550 nm dichroitische Spiegel zur Anregung und ein 580 nm dichroitischer Spiegel zur Aufspaltung der Emission verwendet. Die langwellige Texas-Rot-Fluoreszenz wurde durch einen 605 nm DF55-Durchlaßbereichfilter geschickt. Die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen in einzelnen Zellen wurden unter Verwendung eines Nikon Mikroskops, das mit einem Photoscan II-Photometer verbunden war, gemessen, wobei das Photometer mit zwei R928-PMTs für Doppelaufnahmen ausgestattet war. Auf alle optischen Daten wurde eine 7-Punkt Savitsky-Golay-Glättungsroutine angewandt [A. Savitsky und M. J. E. Golay, 1964, Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure, *Anal. Chem.* 36, 1627–1639], falls nichts anderes angegeben ist. Die 1–2 kHz Einzelwellenlängendaten wurden mit einem Axobasic-Programm aufgenommen, und zwar unter Verwendung der TTL-Pulszählroutine LEVOKE. Konfokalbilder wurden unter Verwendung eines selbstgebautes Hochgeschwindigkeits-Konfokalmikroskops aufgenommen [R. Y. Tsien und B. J. Bacskai, 1994, Video-rate confocal microscopy, in: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J. B. Pawley, Hrsg., Plenum Press, New York]. Die Zelle wurde bei einem Haltepotential von –70 mV Spannungs-abgegriffen. Nach einer Verzögerung von 200 ms wurde die Zelle einem zweiten 200 ms depolarisierenden Rechteck-Spannungsimpuls auf 50 mV ausgesetzt. Pseudofarbenbilder, die das Verhältnis der FL-WGA/Oxonol-Emissionen zeigten, wurden alle 67 ms aufgenommen und zeigten bei Depolarisation der Zelle auf +50 mV eine Veränderung im Verhältnis, und zwar lokalisiert an der Plasmamembran.

**[0172]** Patch-clamp-Aufnahmen wurden unter Verwendung eines mit einer CV-4-Headstage ausgestatteten Axopatch 1-D-Verstärkers von Acon Instruments (Foster City, CA) durchgeführt. Die Daten wurden unter Verwendung der PCLAMP-Software digitalisiert und gespeichert. Die verwendete pH 7,4 Intrazellulärlösung enthielt 125 mM Kaliumglukonat, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 11 mM EGTA und 10 mM HEPES. Für die B104-Zellen wurden 4 mM ATP und 0,5 mM GTP zugesetzt.

**[0173]** Die Quantenausbeute von DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) wurde im Verhältnis zu Rhodamin B in Ethanol ( $F = 0,97$ ) bestimmt [G. Weber und F. W. K. Teale, 1957, Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions, *Faraday Soc. Trans.* 53, 646–655].  $R_0$  wurde gemäß Standardverfahren berechnet [P. Wu und L. Brand, 1994, Resonance energy transfer: methods and applications, *Anal. Biochem.* 218, 1–13]. Die Spektren von FL-WGA in HBSS und DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) in Octanol wurden zur Bestimmung des Überlappungsintegrals verwendet. Werte von 1,4 und 0,67 wurden für den Brechungsindex bzw. den Orientierungsfaktor verwendet.

**[0174]** Symmetrische Bis-(thiobarbiturat)-oxonole wurden als wahrscheinliche Kandidaten für schnelle translocierende fluoreszierende Ionen auf der Basis der vorstehenden Anordnungskriterien ausgewählt. Das starke Absorptionsmaximum ( $\sim 200\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bei 540 nm und die gute Quantenausbeute (0,40) in Membranen macht sie geeignet zur Verwendung als Fluoreszenz-Donoren oder -Akzeptoren in Zellen. Die Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren von DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) sind in [Fig. 2](#) zusammen mit denen für FL-WGA und TR-WGA gezeigt. Die Anregungsspektren sind die kürzeren eines jeden Paares. Als Lösungsmittel für Oxonol wurde Octanol ausgewählt, um die Membrenumgebung nachzuahmen.

[0175] Die Translokationsgeschwindigkeiten wurden in L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen studiert, und zwar unter Verwendung der Gesamtzell-Spannungsabgreifaufnahme (whole cell voltage clamping). Die L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen wurden ausgewählt, da sie sehr geringe Hintergrundströme aufweisen und sehr einfach im Patch-clamp-Verfahren verwendet werden können. Diese Zellen haben ein Ruhepotential von -5 mV und keine offensichtlichen spannungsaktivierten Ströme.

[0176] Verschiebungsströme von DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) bei 20°C sind in [Fig. 3](#) abgebildet. Auf die Zelle wurden 12,5 ms lange Spannungsstufen bei Inkrementen von 15 mV, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV angewandt. Die größeren und schnelleren Übergänge aufgrund eines einfachen Membran-Kapazitätsübergangs konnten auf ein Mindestmaß beschränkt werden, und zwar unter Verwendung der Kapazitäts- und Reihenwiderstands-Kompensationsfähigkeit des Axopatch-Verstärkers, so daß die Verschiebungsströme eindeutig beobachtet werden konnten. Die Ströme entstehen aufgrund einer Umverteilung des Membran-gebundenen Oxonols als Antwort auf 8 Depolarisationen. Die Zeitkonstante für den Verschiebungsstrom beträgt 2 ms für eine Depolarisation von 120 mV. Äquivalente Ladungsmengen bewegen sich am Anfang und am Ende der Spannungsstufe, jedoch in entgegengesetzte Richtung, was mit der Umverteilung von gespeicherten Ionen von einem Energieminimum zum anderen über die Plasmamembran konsistent ist. Darüber hinaus kann die durch die Oxonolbewegung induzierte Kapazität dq/dV zu ~5 pF für eine 100 mV Depolarisation berechnet werden. Dieser Wert entspricht etwa einem Drittel der Membrankapazität ohne den Farbstoff. Interessanterweise sind Natriumkanal-Torladungen auch für etwa 33% der Gesamtkapazität von Squid Axons für kleine Depolarisationen verantwortlich [A. Hodgkin, 1975, The optimum density of sodium channels in an unmyelinated nerve, Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.] 270, 297–300]. In Abwesenheit des Oxonols wurden vernachlässigbare Ströme beobachtet. DiSBA-C<sub>10</sub>-(3) ergab Verschiebungsströme mit etwa der gleichen Geschwindigkeit, wohingegen Analoga mit R=Butyl und Ethyl viel langsamere Ströme ergaben. Die Butylverbindung hatte eine Zeitkonstante von ~18 ms und die Ströme der Ethylverbindung waren sehr klein, langsam und schwer zu beobachten.

[0177] [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) zeigen die Spannungsabhängigkeit und die Zeitkonstanten für die Ladungstranslokation in einer mit etwa viermal soviel Oxonol beladenen Zelle wie im Experiment von [Fig. 3](#). In [Fig. 4](#) stellen die Kreise die Daten der Einschaltantwort und die Quadrate die der Flankenströme dar. Die Rohdaten wurden an eine einfach exponentielle Kurve angepaßt und die bewegte Ladung, die der Fläche entspricht, wurde als das Produkt der Stromamplitude und der Zeitkonstante berechnet. Die experimentellen Daten stimmen vernünftig mit bestehenden Modellen des Transports hydrophober Ionen zwischen zwei Energieminima in der Nähe der wäßrigen Grenzflächen der Lipid-Doppelschicht überein [B. Ketterer, B. Neumcke und P. Länger, 1971, Transport mechanism of hydrophobic ions through lipid bilayer membranes, J. Membrane Biol. 5, 225–245; O. S. Andersen und M. Fuchs, 1975, Potential energy barriers to ion transport within lipid bilayer, Biophys. J. 15, 795–830; R. Benz, P. Länger und K. Janko, 1976, Transport kinetics of hydrophobic ions in lipid bilayer membranes, Biochim. Biophys. Acta 455, 701–720]. Diese Modelle sagen voraus, daß die Gleichgewichts Ladungsverteilung q(V) und die Translokationszeitkonstante (τ) vom extern angewandten Membranpotential V auf folgende Weise abhängen sollen:

$$\Delta q(V) = \Delta q_{\max} \tanh \left[ \frac{q\beta (V - V_h)}{2kT} \right] \quad (1)$$

$$\tau(V) = \tau_{\max} \operatorname{sech} \left[ \frac{q\beta (V - V_h)}{2kT} \right] \quad (2)$$

V<sub>h</sub>, das Membranpotential, bei dem sich die gleiche Ionenanzahl in jeder Senke der potentiellen Energie befindet, sollte aufgrund der Membranasymmetrie von 0 verschieden sein. β ist der Anteil des extern angewandten Potentials, das effektiv am translocierenden Ion anliegt; q ist die Ladung auf jedem Ion, k und T sind die Boltzmann-Konstante und die absolute Temperatur. q<sub>max</sub> bzw. τ<sub>max</sub> ist die Gesamtladung in jeder Energiesenke bzw. die Zeitkonstante für die Translokation, und zwar beide bei V = V<sub>h</sub>. Die glatte Kurve in [Fig. 4](#) stellt die Anpassung an Gleichung 1 mit q<sub>max</sub> = 4770 ± 140 fC, β = 0,42 ± 0,02 und V<sub>h</sub> = -3,8 ± 1,5 mV dar. Gleichermaßen stellt die glatte Kurve in [Fig. 5](#) die Anpassung an Gleichung 2 mit τ<sub>max</sub> = 2,9 ms bei V<sub>h</sub> = -5 mV und β = 0,42 dar.

[0178] Diese Ergebnisse zeigen, daß das Oxonol einen signifikanten Teil des elektrischen Feldes über die Membran abfühlt, daß es in ~3 ms oder weniger translociert und daß die größte Empfindlichkeit und Linearität der Translokation als Funktion des Membranpotential im physiologisch relevanten Bereich liegt.

**[0179]** Um Ladungsverschiebungen in optische Signale umzuwandeln, werden die Oxonol-Fluoreszenzen an den intrazellulären und extrazellulären Membran-Bindungsstellen unterschiedlich gemacht. Fluoreszenz-Asymmetrie wird durch Einführung der fluoreszierend markierten Lektine, die an die extrazelluläre Membranoberfläche gebunden sind, erzeugt. Die Anregung von FL-WGA führt zu einem Energietransfer auf die in der extrazellulären Membran-Bindungsstelle, wie in **Fig. 1** gezeigt, befindlichen Oxonole. Der Extinktionskoeffizient und die Fluoreszenz-Quantenausbeute von FL-WGA wurden zu  $222\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ( $\sim 3$  Fluorescein/Protein) bzw. 0,23 bestimmt. In mit FL-WGA markierten Jurkat-Zellsuspensionen wurden bis zu 30% der Lektin-Fluoreszenzintensität bei Titration von DiSBA-C<sub>4</sub>-(3) gequenchet. Im besten Fall, wobei das gesamte Quenching auf Energietransfer zurückzuführen ist, beträgt der mittlere Abstand des Lektins zum Membran-gebundenen Oxonol immer noch mehr als 50 Å, dem berechneten Förster-Abstand  $R_0$  für das FL-WGA-Oxonolpaar. Die spektrale Überlappung zwischen der FL-WGA-Emission und der DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)-Anregung ist in **Fig. 2** dargestellt. Da der FRET umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands zwischen den beiden Fluorophoren abfällt, ist der Energietransfer zu Oxonolen in der intrazellulären Membranstelle, die weitere 40 Å entfernt ist, möglicherweise vernachlässigbar.

**[0180]** Bei Depolarisation verteilen sich die Oxonolmoleküle so um, daß mehr an die intrazelluläre und weniger an die extrazelluläre Stelle gebunden sind. Diese Änderung zeigt sich durch einen Abfall im Energietransfer, was zu einer Erhöhung der Fluoreszenz von FL-WGA und einer begleitenden Verringerung der Oxonol-Emission führt. Die Fluoreszenzsignale in einer spannungsabgegriffenen L-M(TK<sup>-</sup>)-Zelle, die mit dem DiSBA-C<sub>4</sub>-(3)/FL-WGA-Paar markiert ist und mit 4 sich erhöhenden Spannungsstufen depolarisiert wird, ist in **Fig. 6** gezeigt. Die Daten stellen einen Mittelwert aus 99 Durchläufen dar. Die FL-WGA-Emission erhöht sich um 7–8%, die Oxonol-Fluoreszenz verringert sich um 10% und das FL-WGA/Oxonol-Emissionsverhältnis verändert sich um 19% bei einer 120 mV Depolarisation. Die gleichzeitigen Änderungen der Donor- und Akzeptor-Emissionen ist konsistent mit dem in **Fig. 1** skizzierten FRET-Mechanismus. Die Verringerung der Oxonol-Emission bei Depolarisation ist das Gegenteil von dem, was bei der wenig spannungsempfindlichen Aufnahme von Oxonolen in Zellen beobachtet wurde [Rink et al., 1980, supra]. Die Fluoreszenzänderungen haben Zeitkonstanten von  $\sim 18$  ms bei 20°C, was mit den DiSBA-C<sub>4</sub>-(3)-Verschiebungsströmen übereinstimmt. In Abwesenheit von FL-WGA werden keine großen Fluoreszenzänderungen beobachtet. Die Translokationsgeschwindigkeit von DiSBA-C<sub>4</sub>-(3) erhöht sich bei steigender Temperatur. Die Zeitkonstante fällt auf 7–8 ms bei 29°C ab, was eine Aktivierungsenergie von  $\sim 17$  kcal/mol entspricht. Eine Temperaturerhöhung erhöht jedoch auch die Aufnahme des Lektins und verringert die Fluoreszenzänderung. Die Oxonole mit R=Ethyl und Butyl erreichen auch interne zelluläre Membranen, obwohl eine aktive Membranaufnahme möglicherweise nicht notwendig ist. Eine zusätzliche Abschwächung der spannungsabhängigen FRET-Signale ergibt sich aus der spektralen Überlappung von Fluorescein und Oxonol, so daß ein Teil des Lichts im Fluorescein-Emissionskanal vom Oxonol stammt und umgekehrt.

**[0181]** Die Verlängerung der Alkylketten der Oxonole verbessert die Antwortzeiten signifikant. Das DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)/FL-WGA-Paar hat eine Zeitkonstante von  $\sim 3$  ms bei 20°C, während das DiSBA-C<sub>10</sub>-(3)/FL-WGA-Paar mit einer Zeitkonstante von 2 ms antwortet, wie es in **Fig. 7** gezeigt ist. Die ausgezogene Kurve ist eine Anpassung an eine einfache Exponentialfunktion mit einer 2 ms Zeitkonstante. Die Daten stellen den Durchschnittswert von 3 L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen bei 20°C, aufgenommen bei 2 kHz, dar. Aufgrund der Glättung ist die abgebildete Antwort etwas langsamer als der wahre Wert. Die Fluoreszenz-Zeitkonstanten stimmen mit denen der Verschiebungsströme überein, beispielsweise in **Fig. 3**. Die vorteilhafte Wirkung einer Hydrophobie-Erhöhung des Oxonols in Form längerer Alkylketten erreicht ein Plateau. Die Substitution von Hexyl für Butyl am Oxonolkern führt zu einem großen 6fachen Anstieg der Translokationsgeschwindigkeit. Das Einführen von doppelt so vielen Methylengruppen beim Schritt von der Hexyl- zur Decylverbindung führt jedoch zu einem weniger als 2fachen Anstieg. Diese schneller translocierenden Oxonole sind im wesentlichen in Wasser unlöslich und müssen mit geänderten Verfahren in Zellen beladen werden. DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) kann einfach in normalem Medium, das zusätzlich mit 1,5 mM  $\beta$ -Cyclodextrin zur Komplexbildung der Alkylketten versetzt ist, beladen werden. Nicht-fluoreszierende DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)-Aggregate in Hanks augewogener Salzlösung (HBSS) werden nach Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin fluoreszierend. DiSBA-C<sub>10</sub>-(3) erfordert ein Beladen in einem Medium mit niedrigerer Ionenstärke mit einer durch Saccharose aufrecht erhaltenen Osmolarität. Die Markierung ist nahezu ausschließlich auf die Plasmamembran beschränkt, und zwar vermutlich aufgrund einer Hydrophobie, die nun groß genug ist, um die Desorption von der ersten Membran, auf die der Farbstoff stößt, zu verhindern.

## BEISPIEL V – MESSUNG VON MEMBRANPOTENTIALEN MIT OXONOL-FARBSTOFFEN ALS FRET-AKZEPTOREN UND FLUORESZIERENDEN LIPIDEN ALS FRET-DONATOREN

## A. Trimethinoxonole

**[0182]** Ein 6-Chlor-7-hydroxycumarin, das mittels eines Glycin-Linkers mit Dimyristoylphosphatidylethanolamin (DMPE) gebunden ist, Cou-PE, wurde hergestellt und es wurde entdeckt, daß diese Verbindung als hervorragender spannungsempfindlicher FRET-Donor für Bis-(1,3-dialkyl-2-thiobarbiturat)-trimethinoxonole wirkt. Dieses neue FRET-Paar ergab eine Verhältnisänderung von 80% für eine 100 mV Depolarisation in einer Astrozytomzelle, was das größte in einer Zelle beobachtete spannungsempfindliche optische Signal darstellt, vgl. [Fig. 17](#). Die Spannungsempfindlichkeit dieses FRET-Paares ist demzufolge zwei- bis dreimal besser als die von FL-WGA/Trimethinoxonol in einer Vielzahl von Zelltypen. In L-Zellen werden Verhältniswerte zwischen 25–50% gefunden, die mit den in beiden Kanälen gefundenen prozentualen Änderungen übereinstimmen, vgl. [Fig. 18](#). In neonatalen Herzmyozyten wurden Fluoreszenz-Verhältnisänderungen von 5–30% für spontan erzeugte Aktionspotentiale beobachtet. Die größten Signale sind nahezu viermal größer als die, die mit FL-WGA/Trimethinoxonol möglich sind. Ein Beispiel einer solchen großen Änderung von einem einzelnen Herzzellen-Cluster ist in [Fig. 19](#) gezeigt. Die Vorteile eines Verhältnissignals sind in dieser Figur offensichtlich. Die einzelnen Wellenlängen, in der Figur oben, zeigen eine abfallende Grundlinie, die auf ein Ausbleichen des Fluorophors zurückzuführen ist. Die in der Figur unten gezeigten Verhältnisdaten kompensieren den Intensitätsverlust in beiden Kanälen und führen zu einer flachen Grundlinie. Darüber hinaus führen Bewegungsartefakte zu einer Verbreiterung der einzelnen Wellenlängenantworten. Die Verhältnisdaten verringern diese Artefakte und führen zu einem schärferen Signal, das die tatsächlichen Spannungsänderungen besser darstellt. Die größere Empfindlichkeit für dieses neue FRET-Paar ist am wahrscheinlichsten auf eine Kombination von Faktoren zurückzuführen. Wenn der Donor näher an die Membranoberfläche gebracht wird und der Förster-Transferabstand  $R_0$  verringert wird, könnte dies zu einer verstärkten FRET-Unterscheidung zwischen den mobilen Ionen auf gleichen und gegenüberliegenden Seiten der Membran führen. Auch die erhöhte spektrale Trennung erleichtert das Aufnehmen der Donor- und Akzeptoremission und verringert einen Signalverlust aufgrund von Übersprechen.

## B. Pentamethinoxonole

**[0183]** Bis-(1,3-dialkyl-2-thiobarbiturat)-pentamethinoxonole wurden durch Kondensieren von 1,3-substituierten Thiobarbitursäuren mit Glutacondialdehyddianil-monohydrochlorid, auch als N-[5-(Phenylamino)-2,4-pentadienylden]-phenylamin-monohydrochlorid, hergestellt. Die Pentamethinoxonole absorbieren bei 638 nm ( $\epsilon = 225\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und fluoreszieren maximal bei 663 nm in Ethanol. Die Absorption und Emission ist im Vergleich zu den Trimethinoxonolen um 100 nm zu größeren Wellenlängen verschoben. Diese Verschiebung ist mit anderen Polymethin-Farbstoffen konsistent, wie z. B. Cyaninen, bei denen die Einführung von zwei zusätzlichen Methingruppen zu Wellenlängenverschiebungen von 100 nm in den roten Bereich führt.

**[0184]** Die Pentamethine können in kultivierte Zellen auf die gleiche Weise wie das Trimethinoxonol beladen werden. Die Butylverbindung, DiSBA-C<sub>4</sub>-(5), kann in Hanks ausgewogener Salzlösung beladen werden, während die Hexylverbindung, DiSBA-C<sub>6</sub>-(5), die Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin erfordert, um die Hexyl-Seitenketten zu maskieren und das hydrophobe Oxonol zu solubilisieren.

**[0185]** Ein spannungsempfindlicher FRET von verschiedenen Plasmamembran-gebundenen fluoreszierenden Donoren zu den Pentamethinoxonolen wurde in einzelnen Zellen gezeigt. Es wurde gezeigt, daß FL-WGA einem FRET mit dem Pentamethin unterliegt und Verhältnisänderungen ergibt, die mit den für Trimethinoxonol beobachteten vergleichbar sind. In Astrozytomzellen wurden Verhältnisänderungen von 15–30% für eine 100 mV Depolarisationsstufe ausgehend von –70 mV aufgenommen. Offensichtlich wird die Verringerung des FRET aufgrund des kleineren Überlappungsintegrals  $J$  beim Verschieben der Oxonolabsorption um 100 nm in den langwelligeren Bereich durch eine erhöhte Selektivität des FRET für die extrazelluläre Fläche der Membran im Verhältnis zur intrazellulären und/oder einer verringerten spektralen Überlappung kompensiert.

**[0186]** Es wurde auch entdeckt, daß fluoreszierende Phosphatidylethanolamin-Konjugate als FRET-Donoren für Pentamethinoxonol wirken. Die Strukturen der getesteten PE-Konjugate sind in [Fig. 20](#) gezeigt. Das NBD-PE/Pentamethinoxonol-Paar ergab Verhältnisänderungen von 1–10%/100 mV. Cou-PE/Pentamethinoxonol ergab Verhältnisänderungen von 15–30% in spannungsabgegriffenen Astrozytomzellen für eine Depolarisation von 100 mV. Dieses Paar ist bemerkenswert, da die Cou-PE-Emissions- und DiSBA-C<sub>6</sub>-(5)-Absorptionsmaxima durch 213 nm getrennt sind und es kaum eine sichtbare Überlappung gibt, vgl. [Fig. 21](#). Die große Extinktion des Pentamethins bei großen Wellenlängen läßt einen FRET zwischen dem Cumarin und dem Pentamethin-

oxonol zu. Der  $R_0$ -Wert für dieses Paar wurde zu 37 Å unter Verwendung eines Quantenausbeute-Wertes von 1,0 für Cou-PE berechnet.

**[0187]** Die Membran-Translokationsgeschwindigkeiten für die Pentamethine sind etwa 5–8mal höher als die der Trimethin-Analoga. DiSBA-C<sub>4</sub>-(5) Verschiebungsströme in spannungsabgegriffenen Astrozytomzellen zeigten, daß Butylpentamethinoxonol mit einer Zeitkonstante von ~2 ms als Antwort auf Spannungsstufen von +20–120 mV über die Plasmamembran springt. Das Trimethin-Analoga translociert mit ~18 ms unter identischen Bedingungen. Die Verschiebungsströme von DiSBA-C<sub>6</sub>-(5) fallen sehr schnell ab und sind schwer von der Zellkapazität zu trennen. Als Ergebnis des großen spannungsabhängigen Signals des Cou-PE/DiSBA-C<sub>6</sub>-(5)-Paares war es möglich, die Geschwindigkeit der Spannungsantwort von DiSBA-C<sub>6</sub>-(5) optisch zu messen. Die Zeitkonstante für die DiSBA-C<sub>6</sub>-(5)-Translokation wurde optisch zu  $0,383 \pm 0,032$  ms als Antwort auf eine 100 mV Depolarisationsstufe bestimmt, und zwar unter Verwendung von FRET von asymmetrisch markiertem Cou-PE. Die Verhältnisdaten und die exponentielle Antwort sind in **Fig. 22** gezeigt. Die erhöhten Translokationsgeschwindigkeiten stammen von der größeren Ladungsdelokalisation und einer etwas höheren Hydrophobie des Pentamethinoxonols. Die schnelle Spannungsantwort von DiSBA-C<sub>6</sub>-(5) ist die schnellste, die für ein permeables, hoch-fluoreszierendes Molekül bekannt ist. Die Antwort im Submillisekundenbereich ist schnell genug, um Aktionspotentiale einzelner Neuronen genau aufzuzeichnen.

#### BEISPIEL VI – MESSUNG VON MEMBRANPOTENTIALEN MIT OXONOL-FARBSTOFFEN ALS FRET-DONOREN

**[0188]** Die Richtung des Energietransfers kann durch Verwendung von TR-WGA anstelle von FL-WGA umgekehrt werden. DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) wirkt als FRET-Donor für TR-WGA in L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen mit der gleichen Antwortzeit wie FL-WGA/DiSBA-C<sub>6</sub>-(3). Die spektrale Überlappung dieses FRET-Paares ist in **Fig. 2** gezeigt. Die Signaländerung ist jedoch nur halb so groß wie die für FL-WGA/DiSBA-C<sub>6</sub>-(3).

**[0189]** DiSBA-C<sub>6</sub>-(3) wurde erfolgreich als FRET-Donor für Cy5-markiertes PE in B104-Neuroblastomzellen verwendet. Die Verhältnisänderungen von 5–15%/100 mV sind die größten, die für das mobile Ion als Donor beobachtet wurden.

#### BEISPIEL VII – MESSUNG DES MEMBRANPOTENTIALS IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN

**[0190]** Das FL-WGA/DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)-System wurde in einer Vielzahl von Zelllinien getestet. In neonatalen Herzmiozyten konnten die beiden Fluorophore beladen werden, ohne das spontane Schlagen zu beeinflussen. Daher verhinderte die hinzugefügte Kapazität der Oxonol-Verschiebungsströme nicht die Bildung von Aktionspotentialen. Die periodischen 90 mV Aktionspotentiale [L. Conforti, N. Tohse und N. Sperelakis, 1991, Influence of sympathetic innervation on the membrane electrical properties of neonatal rat cardiomyocytes in culture, J. Devel. Physiol. 15, 237–246] konnten in einem einzigen Durchlauf beobachtet werden, vgl. **Fig. 8C**. Die Verhältnisänderung ohne Abzug von jeglicher Hintergrundfluoreszenz betrug 4–8%. In den Einzelwellenlängendaten wurden Bewegungsartefakte beobachtet. Die **Fig. 8A** und **B** zeigen große langsame Änderungen des nachgewiesenen Lichts, die in beiden Kanälen beobachtet wurden. Diese Effekte konnten jedoch im wesentlichen bei den Verhältnisdaten ausgeschlossen werden. Die Daten wurden bei 100 Hz aufgenommen und es wurden 10 µM Isoproterenol der Badlösung zugesetzt. Die spannungsabhängigen Fluoreszenzänderungen sind schneller als die Artefakte auf mechanischer Basis, was auch erwartet werden konnte [B. C. Hill und K. R. Courtney, 1982, Voltage-sensitive dyes discerning contraction and electrical signals in myocardium, Biophys. J. 40, 255–257]. Einige Zellen, die mit 2,3 µM Oxonol beladen wurden, hörten nach etwa 7 Sekunden kontinuierlichem Aussetzen gegenüber Xenon-Bogenlampenbelichtung auf, zu schlagen. Bei einer Beladung von 0,6 µM wurde die Phototoxizität, aber leider auch das Signal verringert. In differenzierten B104-Neuroblastomzellen wurde ein Anstieg des Verhältnisses von 8% aufgenommen, und zwar ohne jeglichen Hintergrundabzug für eine 120 mV Depolarisation. Die nach innen gerichteten Natriumströme verschlechterten sich nicht aufgrund phototoxischer Effekte während Experimenten mit Anregungszeiten von insgesamt 10–20 Sekunden. FL-WGA/DiSBA-C<sub>6</sub>-(3)-markierte 1321N-Astrozytomzellen zeigten Oxonol und FL-WGA-Fluoreszenz nahezu ausschließlich auf der Plasmamembran.

**[0191]** Verhältnisänderungen von 22–34% für 100 mV wurden in Photometrie-Experimenten beobachtet, vgl. **Fig. 9**. Nach einer 50 ms Verzögerung wurde das Membranpotential 100 ms lang für 100 mV, ausgehend von -70 mV depolarisiert. Die Spuren stellen den Mittelwert von 4 bei 300 Hz aufgenommenen Durchläufen dar, und zwar ohne Glättung. Die Zeitkonstante für die Fluoreszenzänderungen beträgt weniger als 3,3 ms, was mit den Verschiebungsströmen, wie den in **Fig. 3** gezeigten, übereinstimmt. Ein kleines Hintergrundsignal wurde vom Ausgangssignal abgezogen, und zwar < 5% für den Oxonol-Kanal und < 15% für den Fluorescein-

Kanal. Die Fluoreszenzintensitäten in den Fluorescein- und Oxonol-Kanälen erhöhten sich um ~17% bzw. verringerten sich um ~16% für eine 100 mV Depolarisation. In diesen Zellen, anders als bei L-M(TK<sup>-</sup>), verringerte sich das Übersprechen zwischen den Emissionskanälen und im Fluorescein-Signal traten größere Änderungen auf. Diese Signaländerungen sind die größten Membranpotential-abhängigen Verhältnisänderungen im Millisekundenbereich, die in einzelnen Zellen beobachtet wurden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß 4-ANEPPS eine 9%/100 mV Anregungs-Verhältnisänderung ergibt [V. Montane, D. L. Farkas und L. M. Loew, 1989, Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential, *Biochemistry* 28, 4536–4539]. Darüber hinaus sind FL-WGA/DisBA-C<sub>6</sub>-(3)-Fluoreszenzänderungen in jedem Emissionskanal vergleichbar mit den größten berichteten Änderungen, beispielsweise der 21%/100 mV Änderung in einer Neuroblastomzelle unter Verwendung von RH-421 [A. Grinvald, A. Fine, I. C. Farber und R. Hildesheim, 1983, Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes, *Biophys. J.* 42, 195–198]. Die großen Signale von FL-WGA/DisBA-C<sub>6</sub>-(3) ermöglichten die Aufnahme von Verhältnisbildern von Membranpotentialänderungen in spannungsabgegriffenen L-M(TK<sup>-</sup>)- und Astrozytomzellen unter Verwendung eines Hochgeschwindigkeits-Konfokalmikroskops.

**[0192]** Die Astrozytomzellen ergaben eine Erhöhung des Verhältnisses um 10–20%, die an der Plasmamembran für eine 120 mV Depolarisation lokalisiert wurde.

#### BEISPIEL VIII – SYNTHESE VON FLUORESZIERENDEN TETRAARYLBORATEN

**[0193]** Unter Bezugnahme auf [Fig. 10](#) wurden 0,788 g (580 µl, 2,2 mmol) Verbindung I in einem in der Flamme getrockneten 25 ml-Zweihalskolben unter Argon in 6 ml trockenem Hexan gelöst. Nach dem Abkühlen des Kolbens auf –70°C wurden mittels einer Spritze 1,46 ml einer 1,5 M N-Butyllithiumlösung (2,2 mmol) zugegeben. In einem anderen Kolben wurden 0,60 trockenes Boran II in einem sauerstofffreien Gemisch von 6 ml Hexan und 1,5 ml frisch destilliertem THF gelöst. Die Boranlösung wurde dann mittels einer Spritze dem Lithium-Reagenz zugesetzt, worauf sofort ein Niederschlag entstand. Nach etwa 30 Minuten wurde das Kältebad entfernt und man ließ das Reaktionsgemisch langsam erwärmen. Nach 3 Stunden wurde das Lösungsmittel abdekantiert und der Feststoff mit weiterem Hexan gewaschen. Der Feststoff wurde in Acetonitril und Wasser gelöst und dann in einen Scheidetrichter überführt. Die wäßrige Phase wurde erneut mit Hexan gewaschen und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die Hälfte des Extrakts wurde konzentriert, wobei 124,9 mg (170, 5 µmol) des gewünschten Produkts erhalten wurden. Dieses Produkt wurde dann mit 97 mg Tetrabutylammoniumfluorid in Acetonitril 15 Minuten bei Raumtemperatur gemischt. Nach der Aufarbeitung wurden 129,1 mg der Verbindung III als Tetrabutylammoniumsalz erhalten (93%).

<sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-Aceton): 7,61 (breites d, 2H, CF<sub>3</sub>-Phenylgruppe), 7,43 (cm, ~3H, CF<sub>3</sub>-Phenylgruppe), 6,90-7,26 (cm, ~7H, CF<sub>3</sub>-Phenylgruppe), 3,43 (cm, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,81 (cm, ~8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,42 (cm, ~8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,93 (t, J = 7,1 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**[0194]** Unter Bezugnahme auf [Fig. 10](#) wurden zur Synthese von Verbindung IV in einem 5 ml-Rundkolben 14 mg (17,2 µmol) Verbindung III, 7 mg (25,8 µmol) Brommethylbiman, 27,3 mg (172 µmol) Kaliumcarbonat und 5 mg (18,9 µmol) 18-Krone-6 in 0,6 ml trockenem Acetonitril gemischt. Das Gemisch wurde 1,5 Stunden bei 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch in Ethylacetat gelöst und 3× mit Wasser gewaschen. Der organische Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie (Toluol/Aceton (2:1)) gereinigt. Die Hauptbande wurde gesammelt, wobei 12,1 mg (70%) reines Produkt IV als Tetrabutylammoniumsalz erhalten wurde.

<sup>1</sup>H-NMR (d<sub>6</sub>-Aceton): 7,58 (breites d, 2H, CF<sub>3</sub>-Phenylgruppe), 7,4-7,5 (cm, 2H, CF<sub>3</sub>-Phenylgruppe), 7,0-7,3 (cm, ~10H, CF<sub>3</sub>-Phenylgruppe), 5,29 (d, J = 1,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,46 (cm, 8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,56 (d, J = 0,7 Hz, 3H, Biman-Methyl), 1,84 (cm, ~8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,79 (d, J = 0,8 Hz, 3H, Biman-Methyl), 1,76 (s, 3H, Biman-Methyl), 1,44 (cm, ~8H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,98 (t, J = 7,2 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), f = 0,73 in Dioxan auf der Basis von Chininsulfat in 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> f = 0,55.

#### BEISPIEL IX – SYNTHESE VON ASYMMETRISCHEN OXONOLEN MIT EINER LINKER-GRUPPE

(A) Dieses Beispiel veranschaulicht die Synthese von asymmetrischen Oxonolen, die eine eingebaute Linker-Gruppe enthalten. Unter Bezugnahme auf [Fig. 11](#) wurden zur Synthese von Verbindung V 4,35 g (21,7 mmol) 1,12-Diaminododecan in 40 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Mittels einer Spritze wurden 2,62 ml (2,17 mmol) Butylisothiocyanat dem Reaktionskolben zugesetzt. Nach 30 Minuten trat ein weißer Niederschlag auf. 1 Stunde nach der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat eingedampft, wobei ein weißer Feststoff zurückblieb. Der Feststoff wurde in 45 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und mit 2,44 ml N, N-Diisopropylethylamin (DIEA) und 3,9 g (17,9 mmol) Di-t-butyl-dicarbonat gemischt. Nach 1 Stunde Umsetzung wurde das Gemisch in einen Scheidetrichter überführt und mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-

lösung gewaschen. Ein ausgefallener Feststoff wurde abfiltriert (< 100 mg). Die organische Lösung wurde dann mit Wasser und einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde dann mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wurde eingedampft und der erhaltene weiße Feststoff wurde aus Isopropylether umkristallisiert, wobei 4,30 g (10,3 mmol) reine Verbindung V erhalten wurden (Gesamtausbeute: 48%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 5,73 (breites s, 2H, Thioamid), 4,50 (breites s, 1H, Carbamat), 3,40 (breites s, 4H,  $\text{NCH}_2$ ), 3,10 (g,  $J = 7,2$  Hz,  $\sim 3\text{H}$ ,  $\text{CH}_2$  am Carbamat), 1,44 (s, 9H, t-Butyl), 1,2-1,7 (cm, bulk  $\text{CH}_2$ ), 0,94 (t,  $J = 7,2$  Hz, N-Butylmethyl).

**[0195]** Zur Herstellung von Verbindung VI wurden 441 mg (19,2 mmol) Natrium unter Argon in 5 ml trockenem Ethanol gelöst. Nachdem sich nahezu das gesamte Natrium aufgelöst hatte, wurden 2,92 ml (3,1 g, 19,2 mmol) Diethylmalonat zugegeben, wobei ein schwacher Niederschlag auftrat. 4,0 g (9,6 mmol) Verbindung V wurden zugegeben und das Gemisch wurde 70 Stunden unter Argon bei  $100^\circ\text{C}$  unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch filtriert und mit Ethanol gewaschen. Nach der Zugabe von Wasser zum Filtrat trat ein weißer Niederschlag auf. Der Feststoff (799 mg, vorwiegend nicht umgesetztes Ausgangsmaterial) wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde dann auf etwa pH 2 angesäuert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Schicht wurde dann mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden 1,6 g (3,3 mmol) eines gelben Öls erhalten (34%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 4,22 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2$  am Barbiturat), 3,63 (s, 2H, Ring- $\text{CH}_2$ ), 2,99 (cm, 2H,  $\text{CH}_2$  am Carbamat), 1,53 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 1,34 (s, 9H, t-Butyl), 1,1-1,3 (cm, bulk  $\text{CH}_2$ ), 0,85 (t,  $J = 7,4$  Hz, n-Butylmethyl).

**[0196]** Zur Herstellung der Verbindung VII wurde 1 ml Trifluoressigsäure (TFA) unter Rühren zu 200 mg (0,41 mmol) Verbindung VI, gelöst in 3 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , zugegeben. Nach 1,25 Stunden wurde das gesamte Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 1 Äquivalent von jeweils N-[5-(Phenylamino)-2,4-pentadienyliiden]-anilinmonohydrochlorid und 1,3-Di-n-butylthiobarbiturat wurden zugegeben, alle drei Komponenten in 1 ml Pyridin gelöst und über Nacht stehengelassen. Das Produkt wurde mittels Flash-Chromatographie von den anderen Pentamethinonolen abgetrennt. Die unpolaren Produkte wurden mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1) eluiert. Das reine, den Linker enthaltende Produkt wurde mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1) eluiert. Das Produkt war sehr fest am Kieselgel gebunden und nur 10 mg Produkt konnten gewonnen werden.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )/ $\text{CD}_3\text{OD}$ : 7,5-7,8 (cm, 4H, Vinylmethine), 7,35 (t,  $J = \sim 14$  Hz, 1H, mittleres Methin), 4,34 (breites t,  $\sim 10\text{H}$ ,  $\text{NCH}_2$  am Barbiturat), 2,72 (cm,  $\sim 3\text{H}$ ,  $\text{CH}_2$  am Amin), 1,4-1,7 (breites cm,  $\sim 12\text{H}$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 1,0-1,4 (cm,  $\sim 40\text{H}$ , bulk  $\text{CH}_2$ ), 0,81 (p,  $J = 7,3$  Hz, 9H, n-Butylmethyl).

(B) Dieses spezielle Beispiel bezieht sich auf die [Fig. 15](#) und [Fig. 16](#).

**[0197]** N-Butyl-N-5-pentanolthioharnstoff (6): 5-Amino-1-pentanol (1,416 ml, 13 mmol) wurde in 7 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und unter Argon mittels einer Spritze mit Butylisothiocyanat (1,570 ml, 13 mmol) versetzt. Nach 2,5 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wobei ein Öl zurückblieb. Unter Hochvakuum wurde das Öl  $2\times$  mit flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet und über Nacht unter vermindertem Druck belassen. Am nächsten Morgen wurden 2,615 g reines festes Produkt gesammelt (12 mmol, 92%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): d 5,90 (breites s, 2H, NH), 3,66 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H,  $\text{RCH}_2\text{OH}$ ), 3,42 (breites m, 4H,  $\text{NHCH}_2\text{R}$ ), 1,80 (breites s, 1H, OH), 1,3-1,7 (nicht aufgelöste cm, 10H, bulk Methylene), 0,94 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H, Methyl).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): d 181,5 (Thiocarbonyl), 62,2 ( $\text{RCH}_2\text{OH}$ ), 44,2 ( $\text{NHCH}_2\text{R}$ ), 44,1 ( $\text{NHCH}_2\text{R}$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 31,0 ( $\text{CH}_2$ ), 28,6 ( $\text{CH}_2$ ), 23,0 ( $\text{CH}_2$ ), 19,9 ( $\text{CH}_2$ ), 13,6 ( $\text{CH}_3$ ).

**[0198]** 1-Butyl-3-(6-pentanol)-thiobarbiturat (7): 345 mg (15 mmol) Natrium wurden in trockenem Ethanol gelöst und nachdem sich nahezu das gesamte Natrium gelöst hatte, unter Argon mit Diethylmalonat (2,278 ml, 15 mmol) versetzt. Das Gemisch wurde dann auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt, um das ausgefallene Natriummalonat zu lösen. Das Erhitzen wurde dann eingestellt und es wurde N-Butyl-N-5-pentanolthioharnstoff (6) (1,310 g, 6 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3,5 Tage bei  $100^\circ\text{C}$  unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch filtriert und mit EtOH gewaschen. Ein etwa gleiches Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  wurde dem Filtrat zugesetzt und das Filtrat wurde mit konzentrierter HCl auf pH 1-2 angesäuert. Die wäßrige Lösung wurde  $3\times$  mit 1:1 EtOAc/Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, filtriert und konzentriert, wobei ein Öl zurückblieb. Ein DC mit EtOAc/MeOH (4:1) zeigte, daß zusätzlich zum Barbiturat-Hauptprodukt zwei unpolare Verunreinigungen vorlagen. Durch eine Kieselgel-Flash-Chromatographie (4  $\times$  17 cm), EtOAc/MeOH (4:1) konnte eine gewisse Reinigung erreicht werden. Das Material lag nach wie vor als Öl vor und eine zweite Chromatographie mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AA}$  (90:8:2) wurde durchgeführt. Trotzdem das Produkt als Öl vorlag, wurden 0,726 g (2,54 mmol, 42%) reines Produkt gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): d 4,31 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 3,71 (breites s, 2H, Ring-Methylen), 3,63 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H,  $\text{RCH}_2\text{OH}$ ), 2,75 (breites s, 1H, OH), 1,5-1,8 (cm, 6H, bulk Methylene), 1,2-1,5 (cm, 4H, bulk Methylene), 0,94 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H, Methyl).

**[0199]** 1-Butyl-3-(5-brompentan)-thiobarbiturat (8): (7) (98 mg, 343  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 600  $\mu\text{l}$  trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und mit Kohlenstofftetrabromid (142 mg, 429  $\mu\text{mol}$ ) gemischt. Die Lösung wurde auf Eis gekühlt und mit Triphenylphosphin (135 mg, 515  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Es zeigte sich eine Gasentwicklung und die Lösung färbte sich sofort gelb. Nach 30 Minuten wurde das Lösungsmittel entfernt und der feste Rückstand mit Hexan versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht gerührt. Ein DC zeigte nur ein Barbiturat in der Hexanlösung, zusammen mit Triphenylphosphinoxid. Die Verunreinigung wurde mittels Kieselgel-Flash-Chromatographie ((2,5  $\times$  22 cm), befüllt mit EtOAc/MeOH (98:2)) entfernt. Die unpolare Verunreinigung wurde mit dem Befüllungslösungsmittel und nachfolgend mit EtOAc/MeOH (90:10) von der Säule gewaschen. Das gewünschte Produkt wurde mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AA}$  (93:5:2) eluiert, wobei 40 mg (115  $\mu\text{mol}$ , 34%) erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): d 4,33 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 3,72 (s, 2H, Ring-Methylen), 3,42 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H,  $\text{RCH}_2\text{Br}$ ), 1,91 (cm, 2H, Methylen), 1,66 (cm, 4H, Methylene), 1,52 (cm, 2H, Methylen), 0,95 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H, Methyl).

**[0200]** 1,3-Dibutyl-5-(3-phenylaminopropendienyl)-thiobarbiturat (10): Malonaldehyd-bis-(phenylimin) (500 mg, 1,69 mmol) wurde in 20 ml trockenem DMF gelöst. Getrennt davon wurde 1,3-Dibutylthiobarbiturat (430 mg, 1,76 mmol) in 5 ml trockenem Pyridin gelöst und in einen 10 ml Tropftrichter überführt. Die Thiobarbituratlösung wurde langsam während 5 Minuten zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 5 Stunden gerührt. Das Gemisch wurde mit etwa 20 ml Wasser versetzt, worauf ein gelber Niederschlag entstand. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet, wobei 575 mg (1,5 mmol, 89%) erhalten wurden. Geringere Verunreinigungen, einschließlich Oxonol, wurden mittels Kieselgel-Flash-Chromatographie ((3  $\times$  15 cm), EtOAc/Hexan (1:1)) entfernt. Ein Teil des Materials fiel auf der Säule aus. Nach dem Trocknen wurden 390 mg reines Produkt erhalten (1 mmol, 59%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}$ ): d 8,10 (d,  $J = 3,0$  Hz, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,3-7,5 (cm, 3H), 7,1-7,25 (cm, 3H), 4,40 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 1,65 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{R}$ ), 1,36 (cm, 4H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0,90 (t,  $J = 7,3$  Hz, 6H, Methylgruppen).

**[0201]** 1-(1,3-Dibutylthiobarbiturat)-3-(1-butyl-3-(5-hydroxypentyl)-thiobarbiturat)-trimethinoxonol-triethylammoniumsalz (11): Verbindung (7) (85 mg, 297  $\mu\text{mol}$ ) wurde mit (10) (114 mg, 297  $\mu\text{mol}$ ) in 1,2 ml trockenem Pyridin gelöst und 17 Stunden gerührt. Ein DC (EtOAc/MeOH) zeigte 3 Oxonol-Hauptprodukte an. 80% des Reaktionsgemisches wurden mit konzentrierter HCl unter Bildung eines Niederschlags versetzt, filtriert und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 220 mg eines roten Feststoffs erhalten. 96 mg dieses Feststoffs wurden mit 1–2 ml EtOAc gemischt und filtriert. Der verbliebene Feststoff wurde in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5) gelöst und auf eine Kieselgel-Säule (19  $\times$  2,5 cm) aufgegeben. Nach dem Eluieren mit dem gleichen Lösungsmittel wurde der größte Teil des unpolaren Oxonols von der Säule gewaschen. Das Lösungsmittel wurde dann durch  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$  (90:8:2) versetzt, um die mittlere Bande zu eluieren, die sich mittels NMR-Analyse als das gewünschte Produkt herausstellte. Nach dem Konzentrieren und Trocknen wurden 18,5 mg (28  $\mu\text{mol}$ , 27%) des reinen Produkts erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): d 8,60 (t,  $J = 13,9$  Hz, 1H, mittleres Methin), 8,14 (dd,  $J_1 = 13,8$  Hz,  $J_2 = 2,2$  Hz, 2H, Methine), 4,45 (cm, 8H,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 3,66 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H,  $\text{RCH}_2\text{OH}$ ), 3,20 (q,  $J = 7,3$  Hz, 6H, Triethylammonium), 1,5-1,8 (cm, 8H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{R}$ ), 1,2-1,5 (cm, 10H, bulk Methylene), 1,35 (t,  $J = 7,3$  Hz, 9H, Triethylammonium), 0,95 (t,  $J = 7,2$  Hz, 9H, endständiges Methyl). MS.

**[0202]** 1-(1,3-Dibutylthiobarbiturat)-3-(1-butyl-3-(5-tosyloxyentyl)-thiobarbiturat)-trimethinoxonol (12): (11) (86,1 mg, 131  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 4 ml Pyridin mit Tosylchlorid (333 mg, 1,75 mmol) gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde 3,5 Stunden gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde in EtOAc gelöst und mit 1 M HCl und 2 $\times$  mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Ein DC in EtOAc/MeOH (9:1) zeigte, daß der größte Teil des Ausgangsmaterials in ein eher unpolares Produkt umgewandelt wurde. Eine polare Oxonolverunreinigung war jedoch offensichtlich und das Material mußte weiter mit Flash-Chromatographie gereinigt werden. Die Säule wurde mit  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (97:3) beschickt. Es war erforderlich, die Polarität auf  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (92:8) zu erhöhen, um das Produkt von der Säule zu waschen. Die das gewünschte Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und getrocknet, wobei 74,8 mg (102  $\mu\text{mol}$ , 78%) des Produkts erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): d 8,50 (t, 1H, mittleres Methin), 7,92 (dd,  $J_1 = 14$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz, 2H, Methine), 7,81 (d, 2H, Tosyl), 7,35 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H, Tosyl), 4,37 (cm, 8H,  $\text{NCH}_2\text{R}$ ), 4,09 (breites t, 2H,  $\text{RCH}_2\text{Ots}$ ), 2,45 (s, 3H, Tosylmethyl), 1,2-1,9 (nicht aufgelöstes cm, Bulk-Methylene), 0,91 (p,  $J = 7,2$  Hz, 9H, endständiges Methyl).

#### BEISPIEL X – SYNTHESE VON FLUORESZIERENDEN LANTHANID-CHELATEN MIT EINER EINZELNEN NEGATIVEN LADUNG

**[0203]** Terbium(III)-bis-(N,N'-bis-(salicyliden)-ethylendiamin)-piperidiniumsalz,  $\text{Hpip}^+ \text{Tb}(\text{SALEN})_2^-$ : N,N'-Bis-(salicyliden)-ethylendiamin (SALEN) (0,719 g, 2,68 mmol) wurde bei 60°C in 40 ml MeOH gelöst und mit Ter-

biumchloridhexahydrat (0,5 g, 1,34 mmol) in 1 ml Wasser versetzt. Anschließend wurde Piperidin (536 µl, 5,42 mmol) zugesetzt, worauf sich ein gelber Niederschlag bildete. Nach 1 Stunde wurde das Erhitzen eingestellt und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet, wobei 709 mg (0,91 mmol, 68%) des gewünschten Komplexes erhalten wurden.

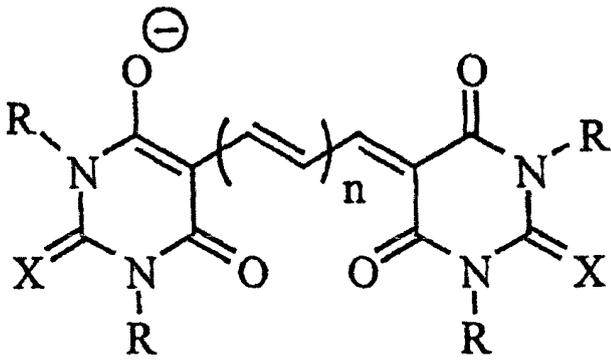
Elektrospray-MS (neg. Ion) [MeOH/H<sub>2</sub>O: 95/5] (Peak, rel. Int.) 691,2 (M<sup>-1</sup>, 100), berechnet M<sup>-1</sup> = 691,5 amu.

**[0204]** Europium(III)-bis-(N,N'-bis-(salicyliden)-ethylendiamin)-piperidinium, Hpip<sup>+</sup> Eu(SALEN)<sub>2</sub><sup>-</sup>: N,N'-Bis-(salicyliden)-ethylendiamin (SALEN) (0,360 g, 1,34 mmol) wurde bei 60°C in 40 ml MeOH und Piperidin (298 µl, 3,02 mmol) gelöst und mit Europiumchloridhexahydrat (0,246 g, 0,67 mmol) in 0,5 ml Wasser versetzt, worauf sich sofort ein gelber Niederschlag bildete. Nach 1 Stunde wurde das Erhitzen eingestellt und das Reaktionsgemisch für 2 Stunden stehengelassen. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet, wobei 341 mg (0,44 mmol, 66%) des gewünschten Komplexes erhalten wurden.

**[0205]** Die vorstehende Erfindung wurde anhand von Erläuterungen und Beispielen zum Zwecke der Klarheit und Verständnis genauer beschrieben. Für den Fachmann wird es naheliegend sein, dass Veränderungen und Modifikationen in den Umfang der anhängenden Patentansprüche fallen. Die vorstehende Beschreibung soll daher zur Veranschaulichung dienen und nicht beschränkend sein. Der Umfang der Erfindung sollte daher nicht nur unter Bezugnahme auf die Beschreibung bestimmt werden, sondern auch unter Bezugnahme der folgenden anhängenden Patentansprüche zusammen mit den umfassenden Äquivalenten die in die Patentansprüche fallen.

### Patentansprüche

1. System zur Bestimmung des elektrischen Potentials über einer Membran umfassend:
  - a) eine Anregungslichtquelle zur Fluoreszenzanregung,
  - b) einen Detektor zur Emissionsmessung,
  - c) ein erstes Reagenz umfassend: ein hydrophobes fluoreszierendes Ion, das zur Umverteilung von einer Seite einer Membran zu einer zweiten Seite dieser Membran als Antwort auf ein Potential über diese Membran fähig ist, und
  - d) ein zweites Reagenz, das ein Chromophor umfasst und einen Energietransfer mit dem ersten Reagenz durchmacht oder die Fluoreszenz des ersten Reagenz löscht, wobei die ersten und zweiten Reagenzien nicht durch eine Linkergruppe verbunden sind.
2. System nach Anspruch 1, weiter umfassend einen Detektor zur Emissionsdetektion von Doppelwellenlängen.
3. Detektor nach Anspruch 2, worin der Detektor weiter einen Photomultiplier zur Lichtemissionsdetektion bei einer bestimmten Wellenlänge umfasst.
4. System nach Anspruch 1, weiter umfassend Optiken zur konfokalen Detektion.
5. System nach Anspruch 1, weiter umfassend eine Zelle.
6. System nach Anspruch 5, wobei die Zelle eine eukaryontische Zelle ist.
7. System nach Anspruch 5, wobei die Zelle mit einer Spannungsklemme versehen ist.
8. System nach Anspruch 5, wobei die Zelle mindestens einen exogenen Ionenkanal, Transporter, Pumpe oder Austauscher umfasst.
9. System nach Anspruch 5, wobei sich die Zelle in einer Platte mit mehreren Vertiefungen befindet.
10. System nach Anspruch 1, worin das erste Reagenz ein Oxonol umfasst.
11. System nach Anspruch 10, worin das Oxonol die allgemeine Formel (I) hat:



worin:

R unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, Hydrocarbyl und Heteroalkyl;  
 X Sauerstoff oder Schwefel ist; und  
 n eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist;  
 und Salze davon.

12. System nach Anspruch 11, worin X Schwefel ist.

13. System nach Anspruch 12, worin R eine C<sub>4-40</sub>-Alkylgruppe, vorzugsweise eine C<sub>5-20</sub>-Alkylgruppe ist.

14. System nach Anspruch 1, worin das zweite Reagenz ein grün fluoreszierendes Protein umfasst.

15. System nach Anspruch 1, worin das zweite Reagenz ein fluoreszent markiertes Protein umfasst.

16. System nach Anspruch 1, worin das zweite Reagenz ein Cumarin umfasst.

17. System zur Bestimmung des elektrischen Potentials über einer Membran umfassend:

a) eine Anregungslichtquelle zur Fluoreszenzanregung,

b) einen Detektor zur Emissionsmessung,

c) ein erstes Reagenz umfassend: ein hydrophobes fluoreszierendes Ion, das zur Umverteilung von einer Seite einer Membran zu einer zweiten Seite dieser Membran als Antwort auf ein Potential über diese Membran fähig ist, und

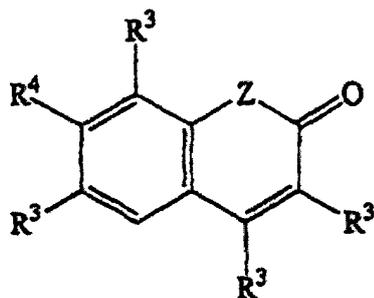
d) ein zweites Reagenz, das ein Chromophor umfasst und einen Energietransfer mit dem ersten Reagenz durchmacht oder die Fluoreszenz des ersten Reagenz löscht, wobei das zweite Reagenz ein grün fluoreszierendes Protein, ein fluoreszent markiertes Protein oder ein Cumarin umfasst.

18. System nach Anspruch 14 oder 17, worin das grün fluoreszierende Protein Membran-assoziiert ist.

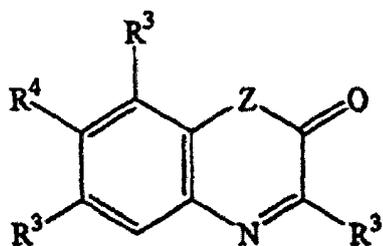
19. System nach Anspruch 16 oder 17, worin das Cumarin ein Lipid umfasst.

20. System nach Anspruch 19, worin das Cumarin, das ein Lipid umfasst, ein Cou-Lipid ist, worin:

Cou die Formel:



oder



aufweist, worin:

jeweils  $R^3$ , das gleich oder unterschiedlich sein kann, unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, Halogen,  $C_{1-6}$ -Alkyl, CN,  $CF_3$ ,  $COOR^5$ ,  $CON(R^5)_2$ ,  $OR^5$  und einem Verknüpfungspunkt für ein Lipid;  $R^4$  ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus  $OR^5$  und  $N(R^5)_2$ ;

Z O, S oder  $NR^5$  ist; und

jeweils  $R^5$ , das gleich oder unterschiedlich sein kann, unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H,  $C_{1-6}$ -Alkyl und einem Verknüpfungspunkt für ein Lipid.

Es folgen 21 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

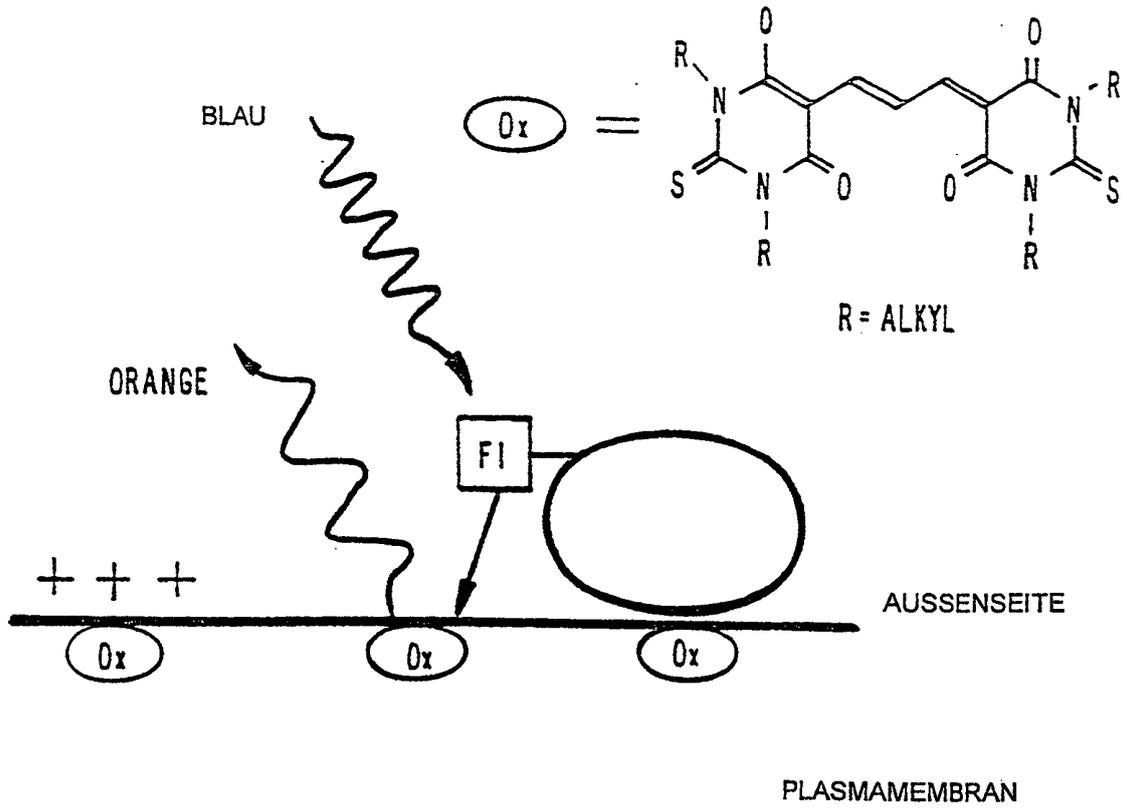


FIG. 1A.

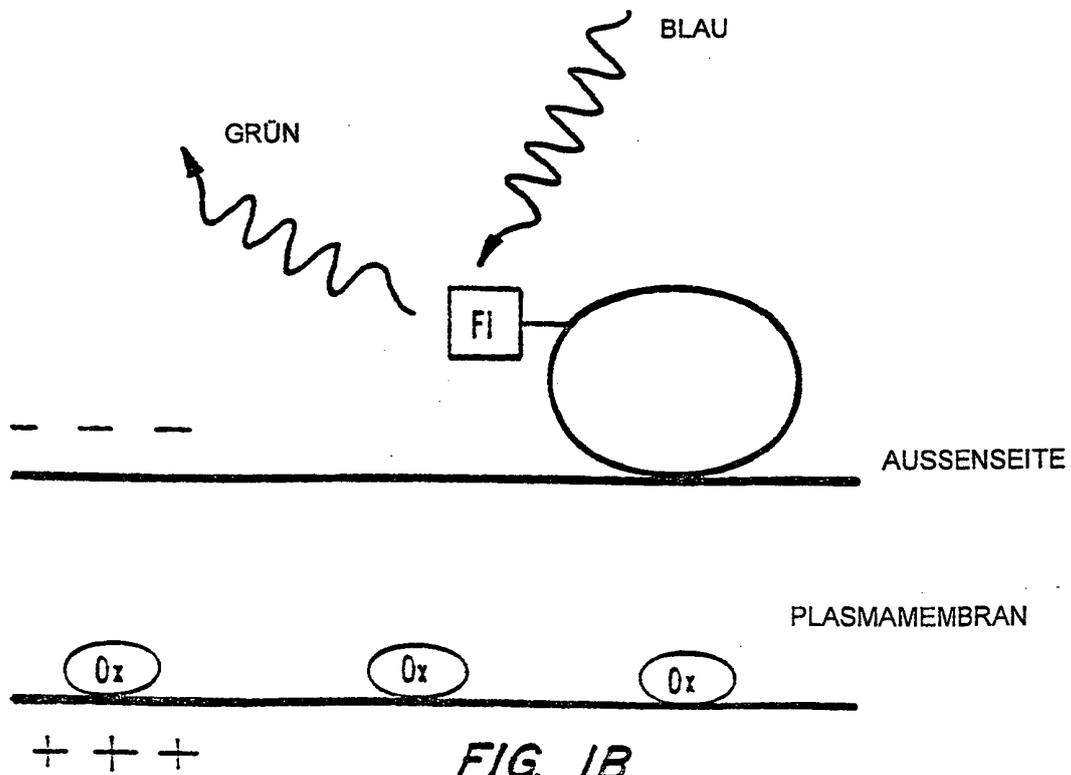


FIG. 1B.

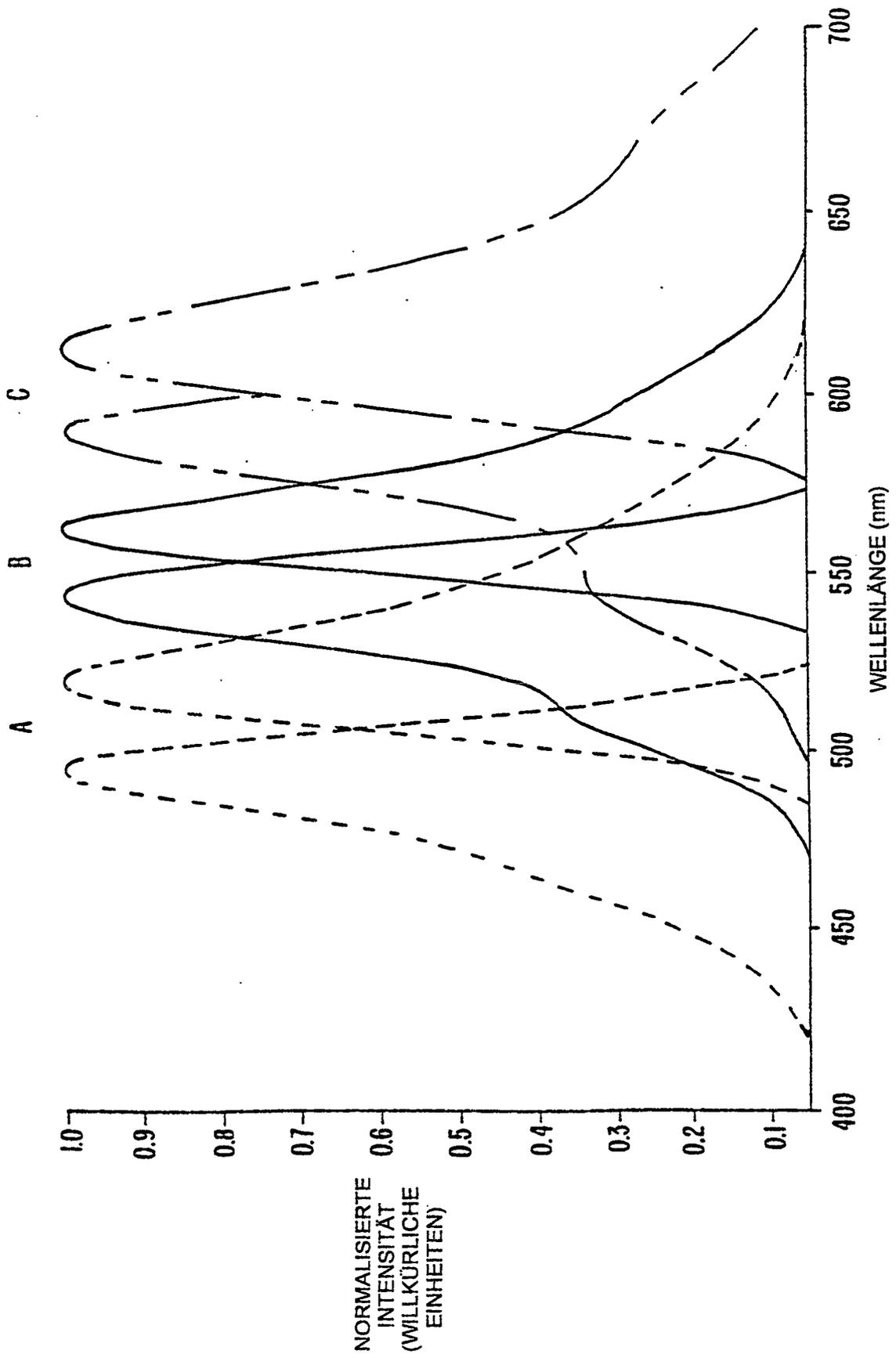
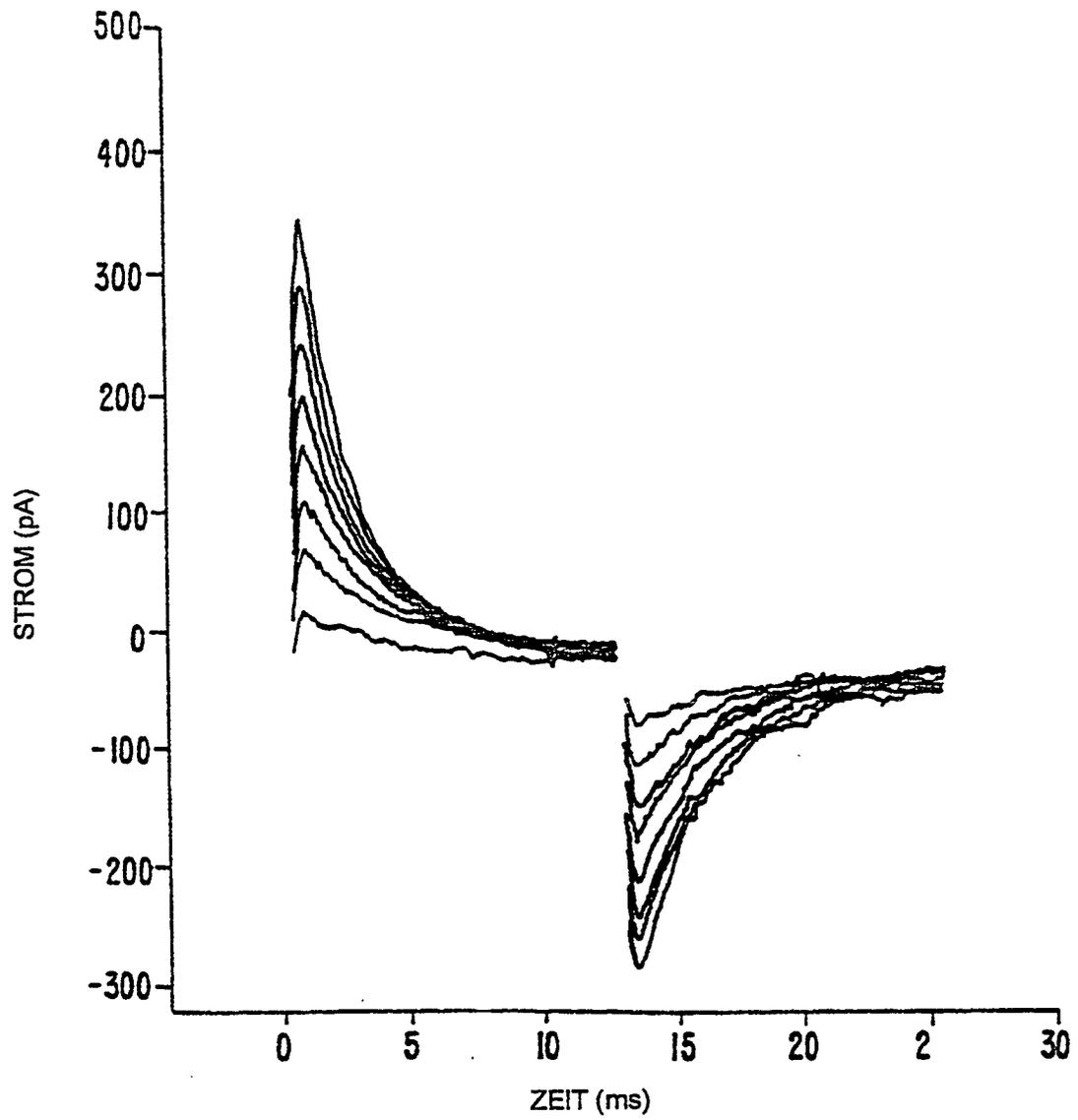


FIG. 2.



*FIG. 3.*

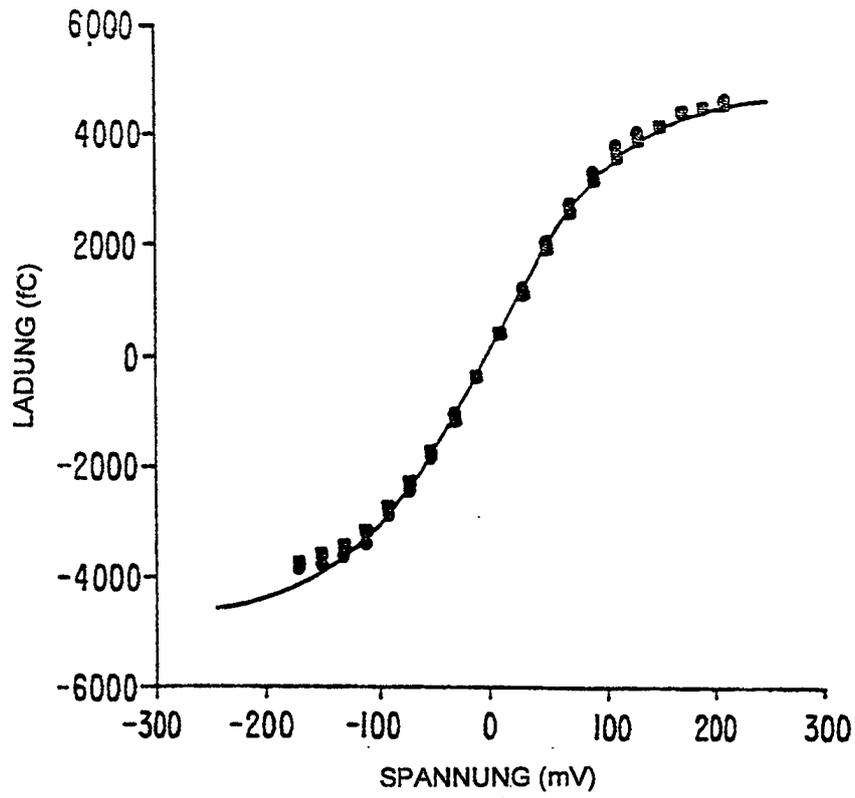


FIG. 4.

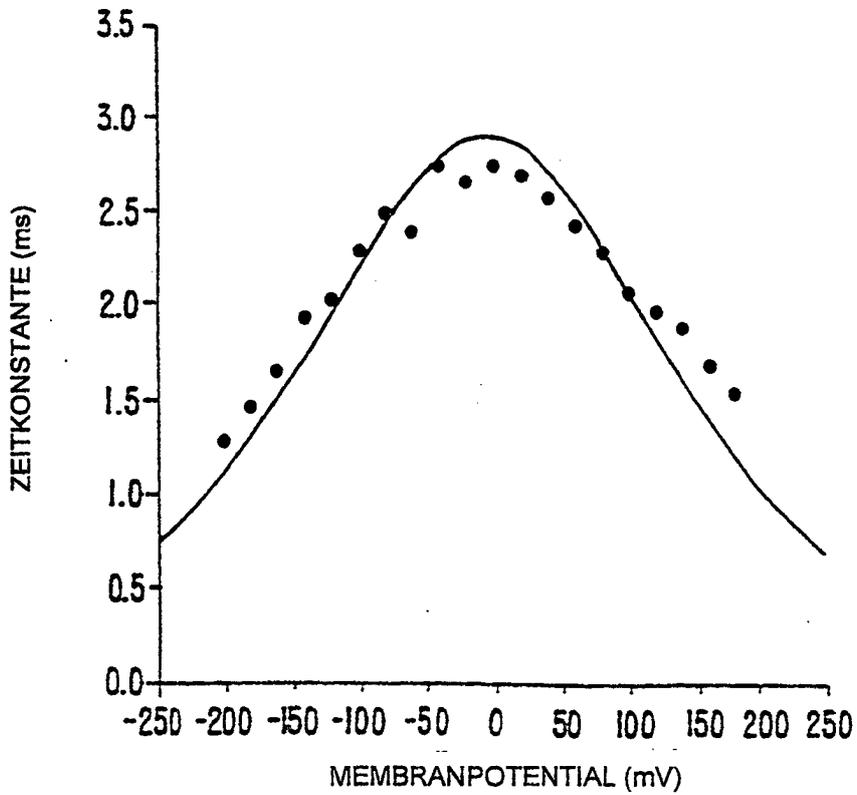


FIG. 5.

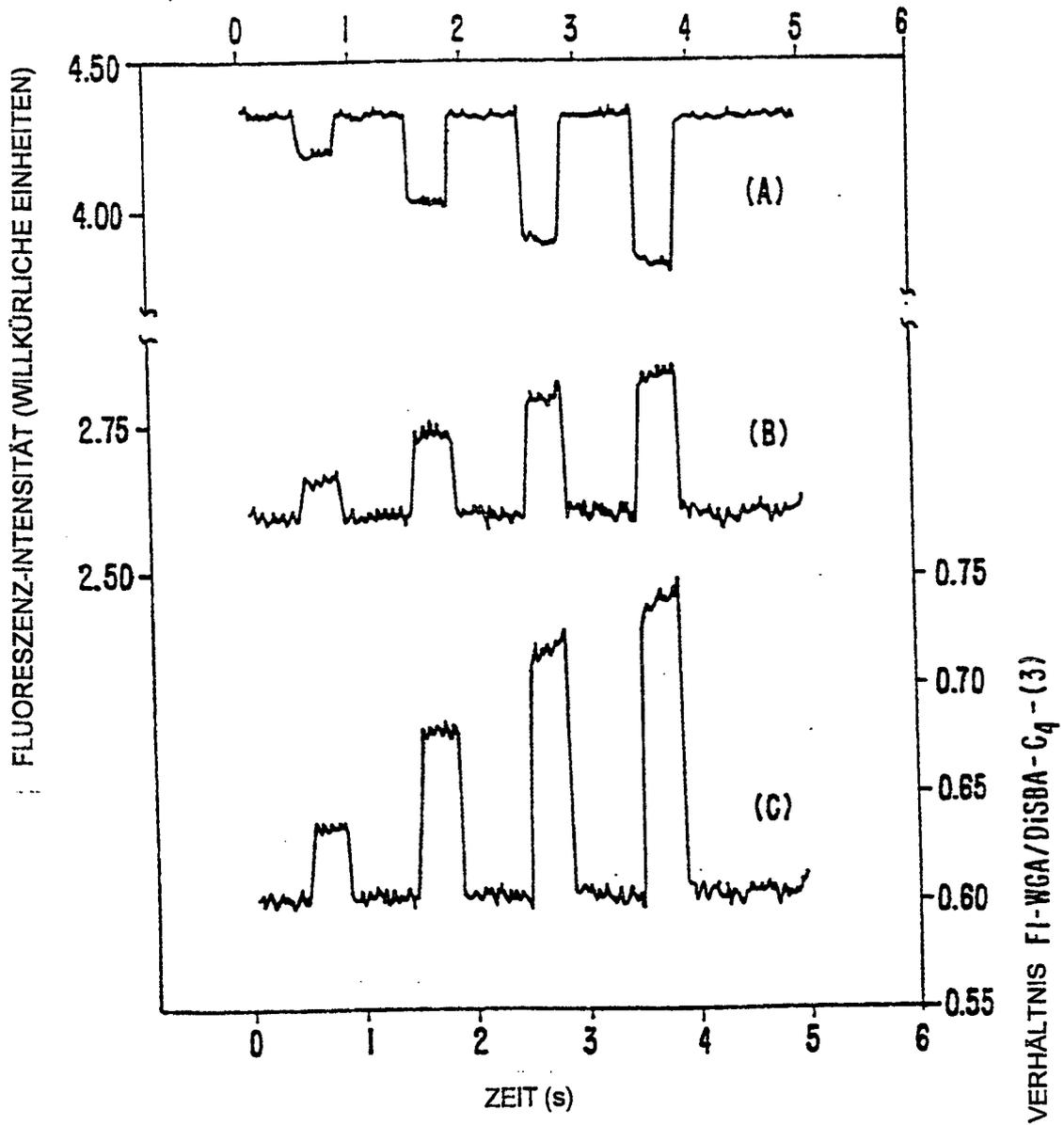
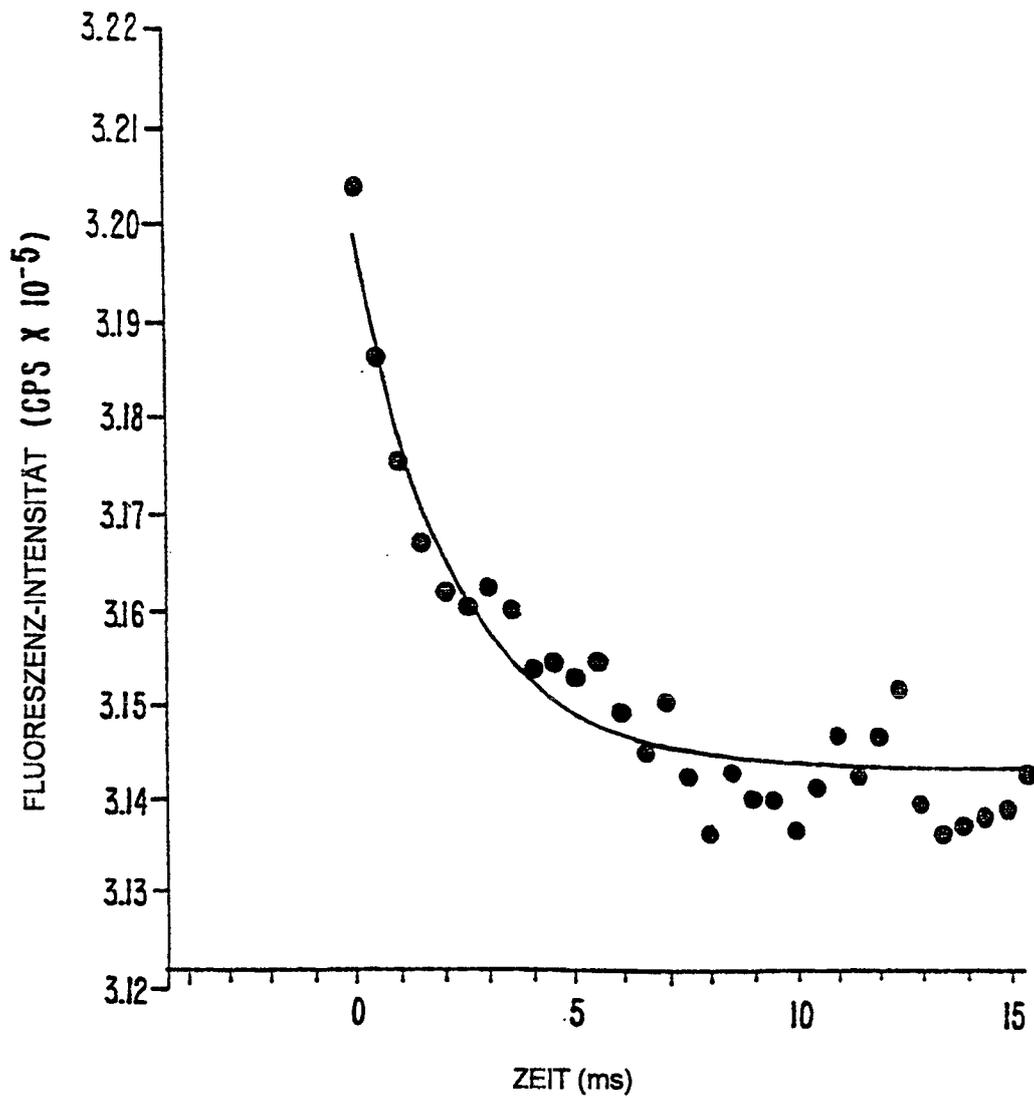


FIG. 6.



**FIG. 7.**

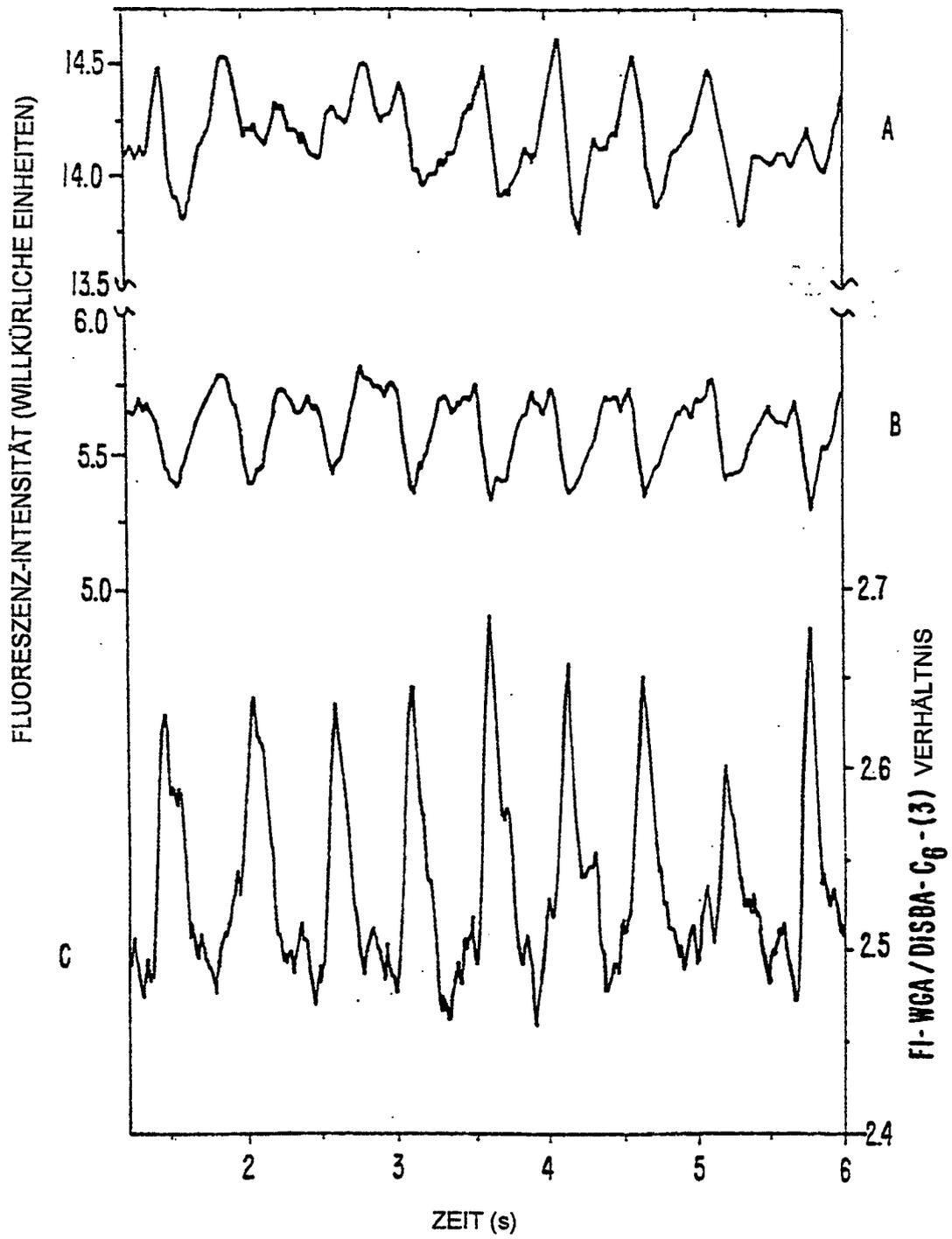


FIG. 8.

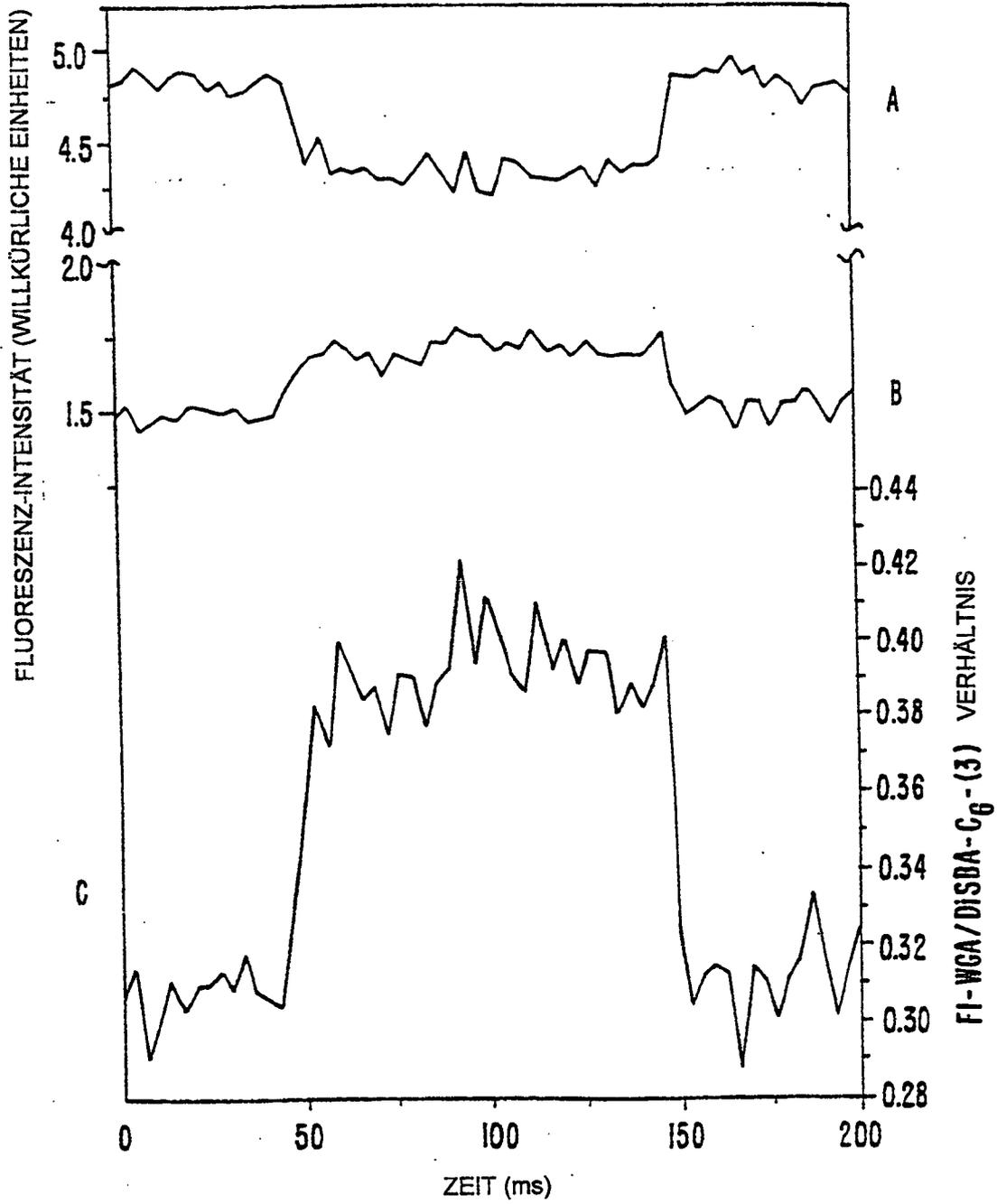


FIG. 9.

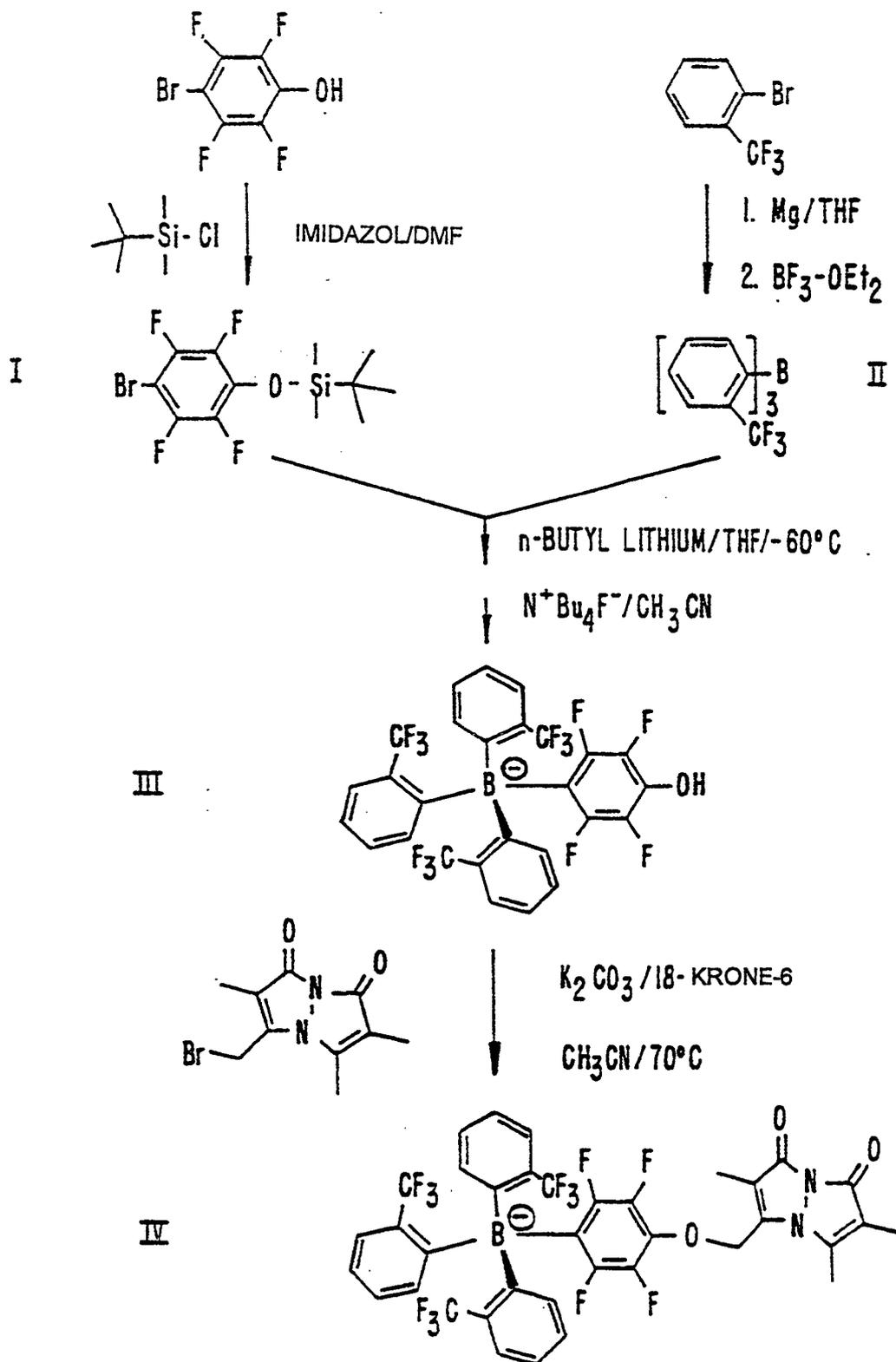


FIG. 10.

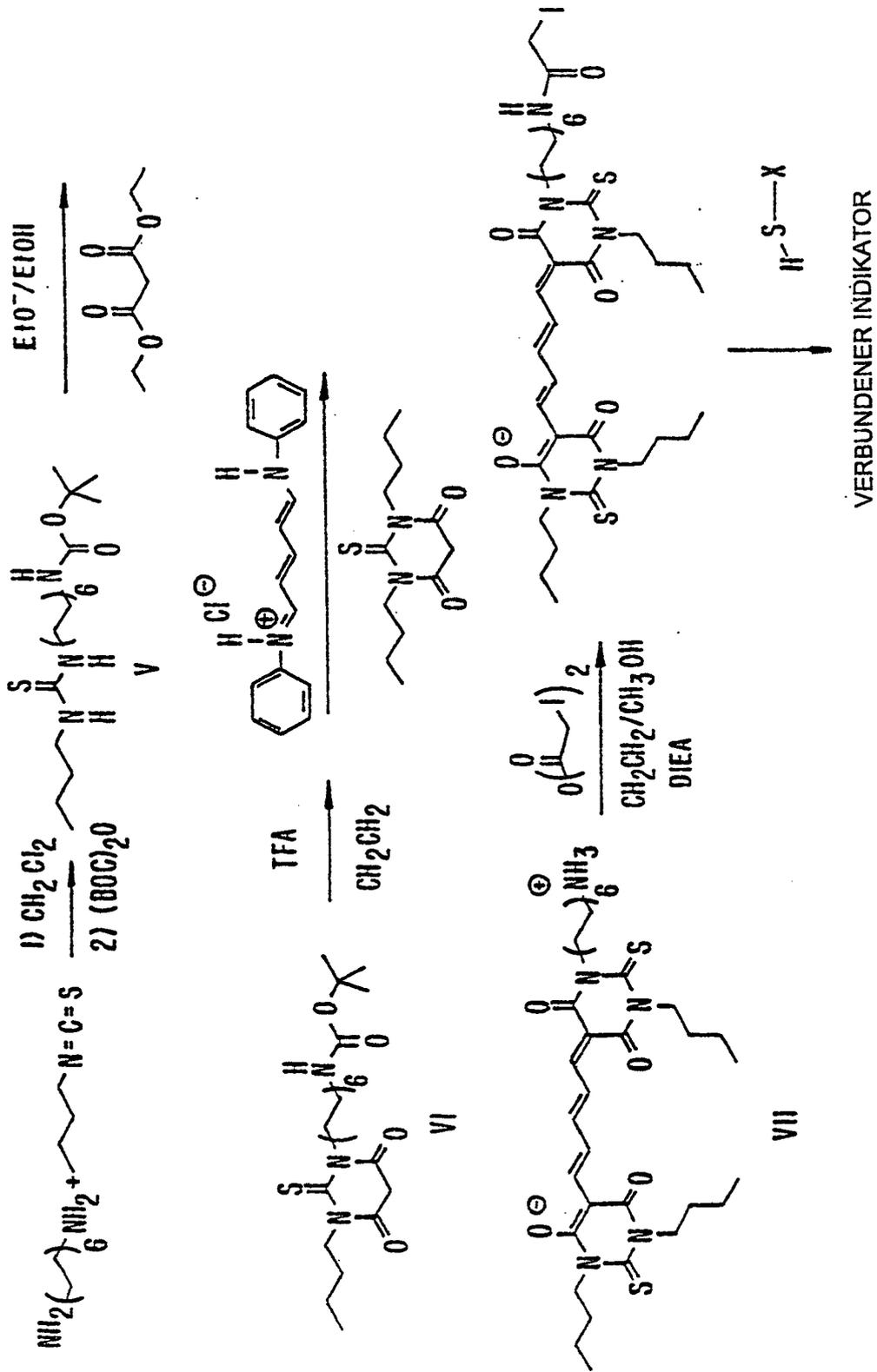


FIG. 11.

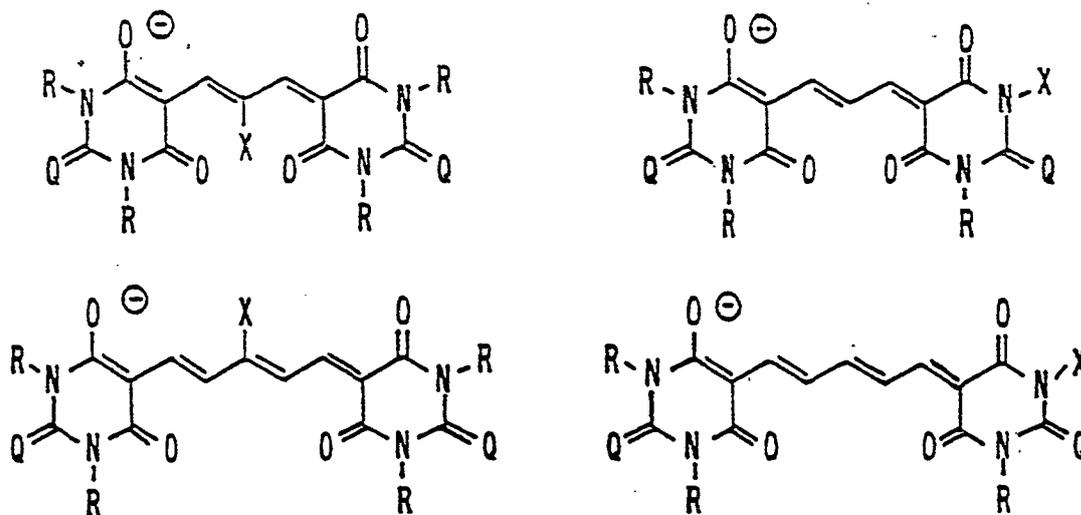


FIG. 12.

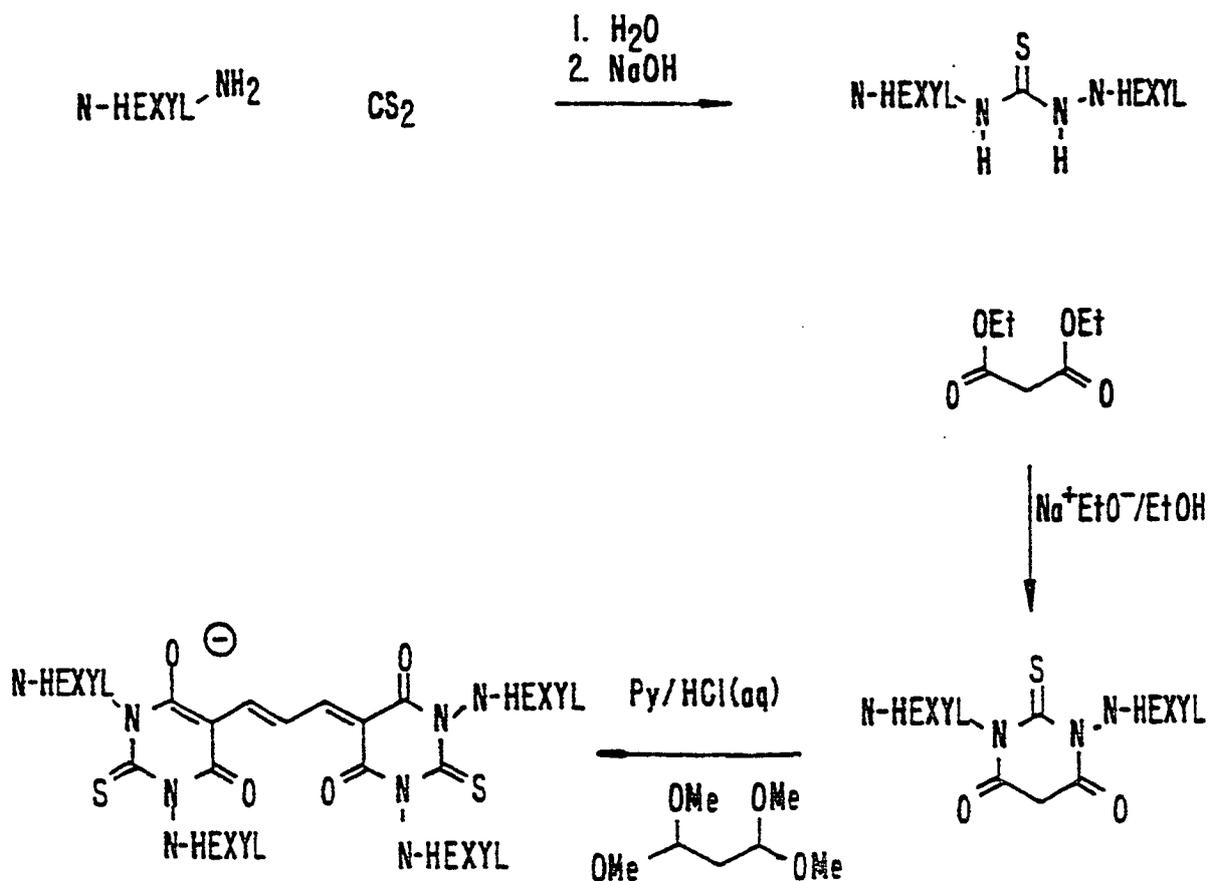


FIG. 13.

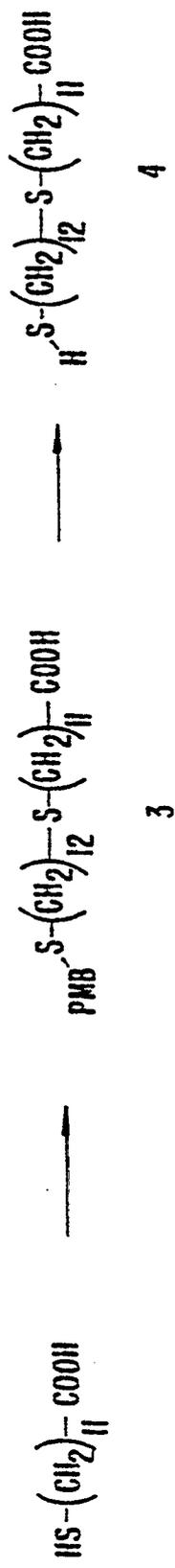
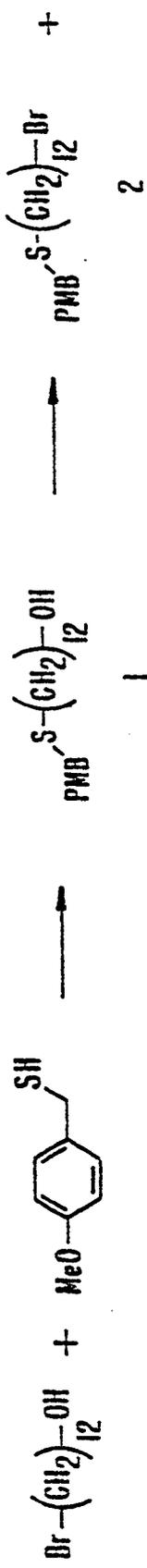


FIG. 14.

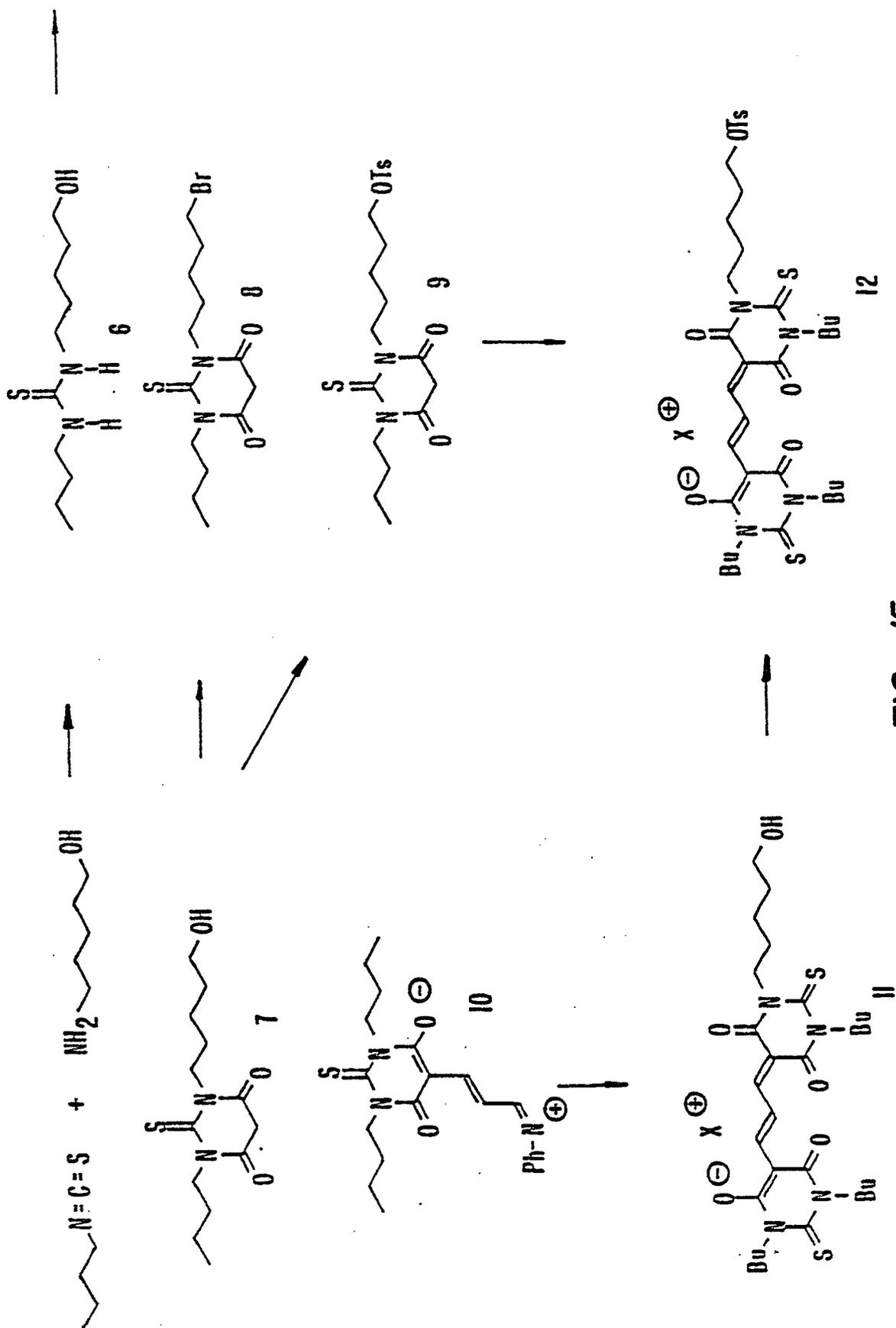


FIG. 15.

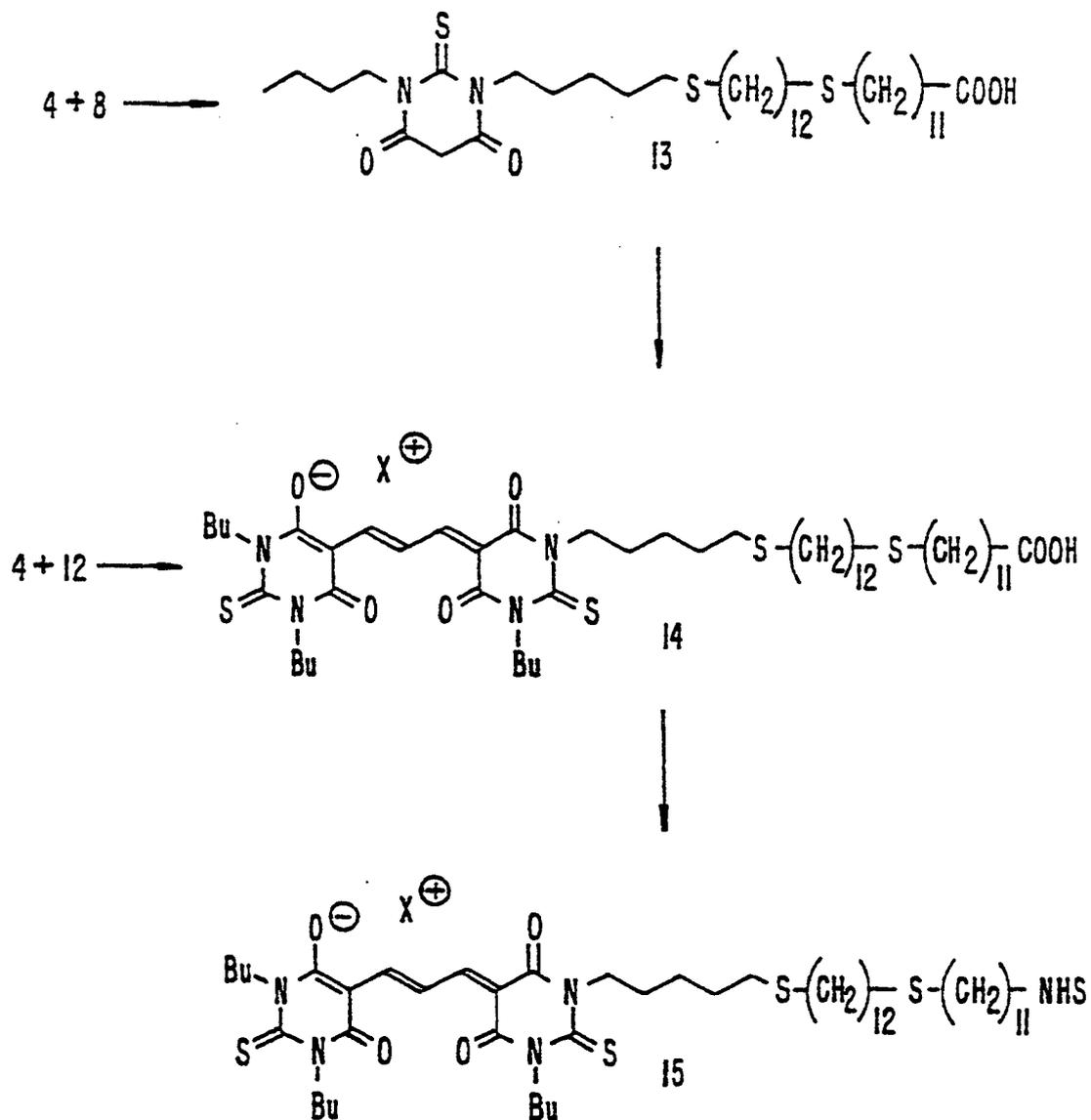
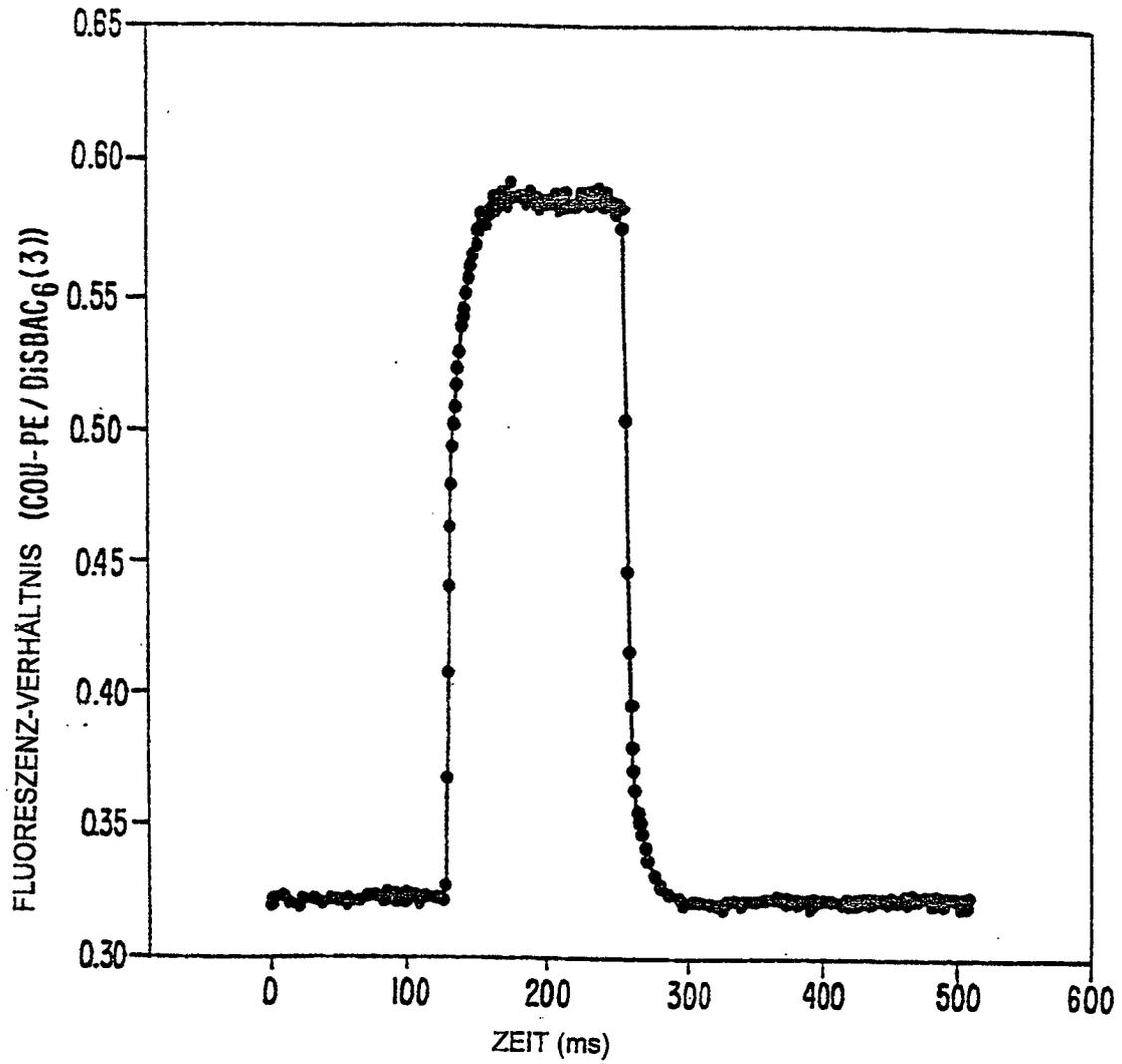
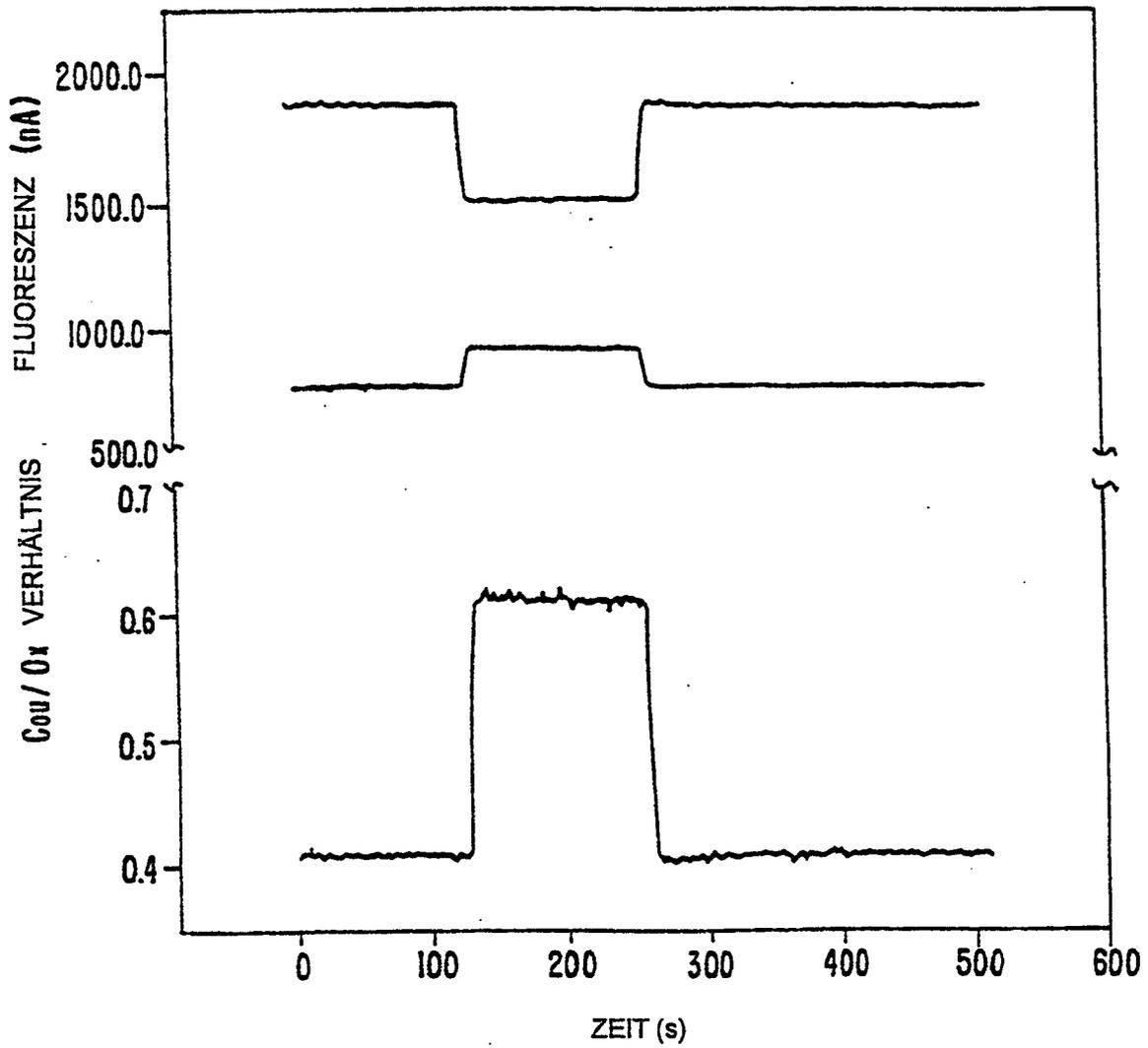


FIG. 16.



*FIG. 17.*



**FIG. 18.**

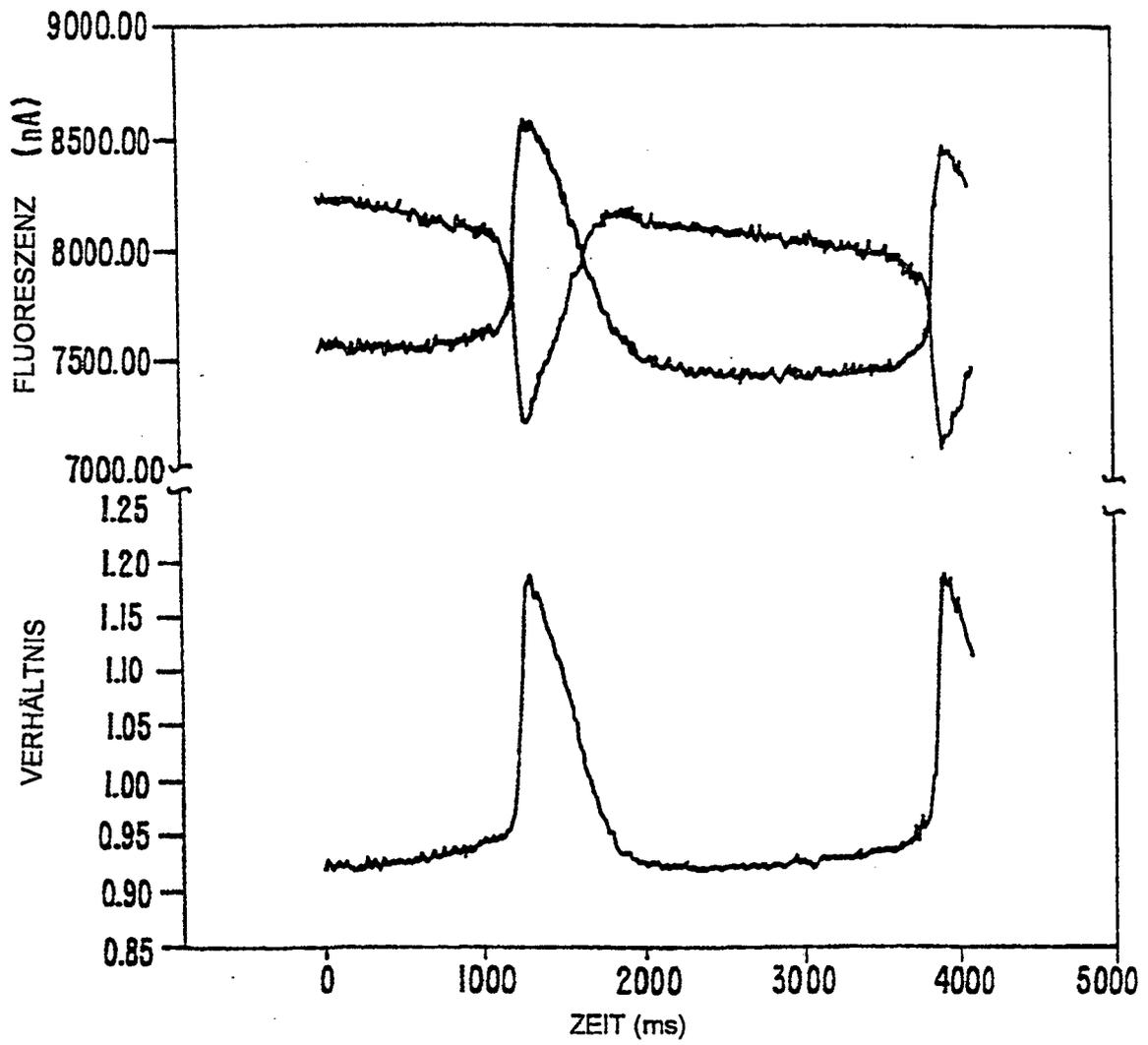
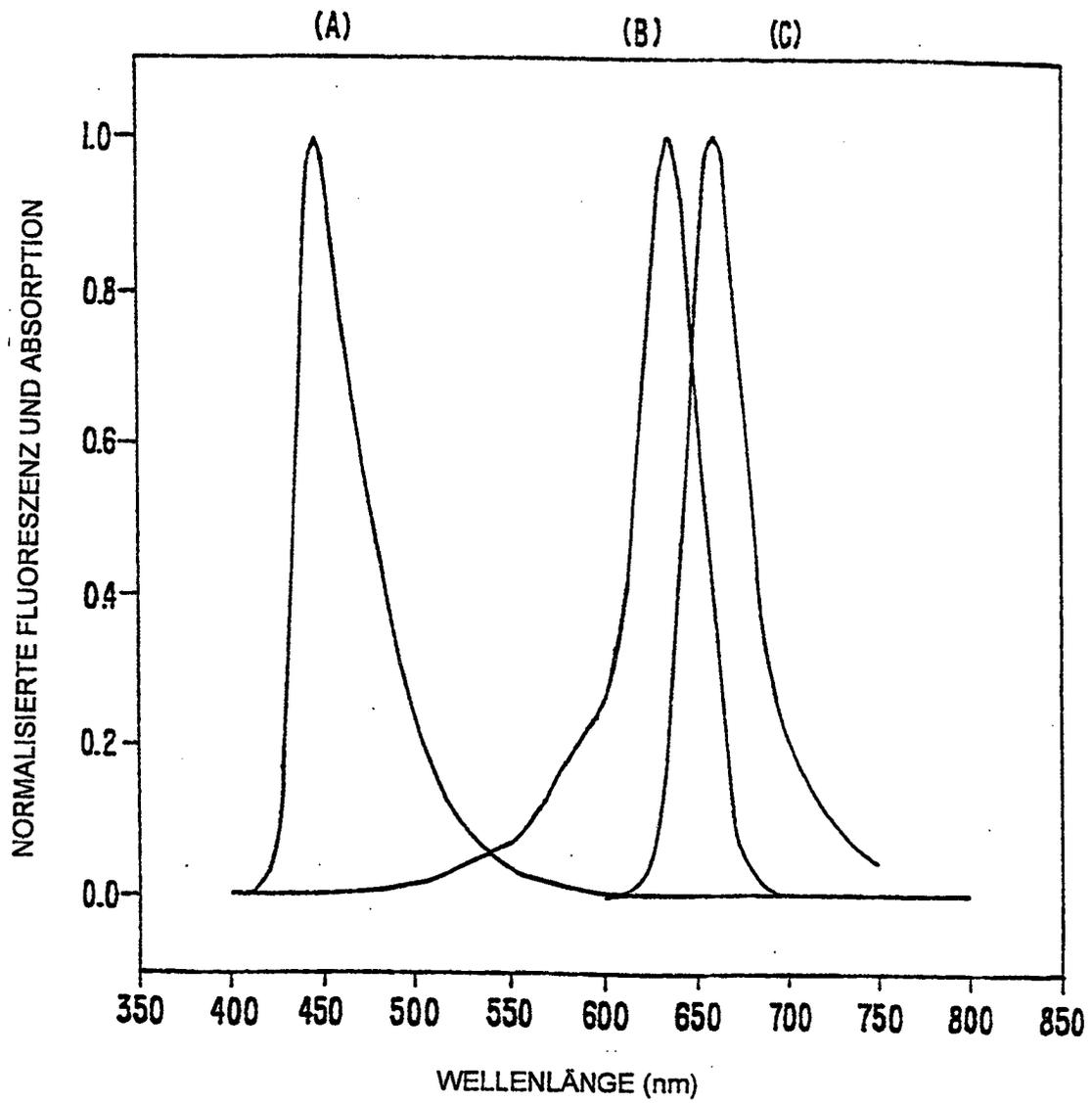


FIG. 19.





**FIG. 21.**

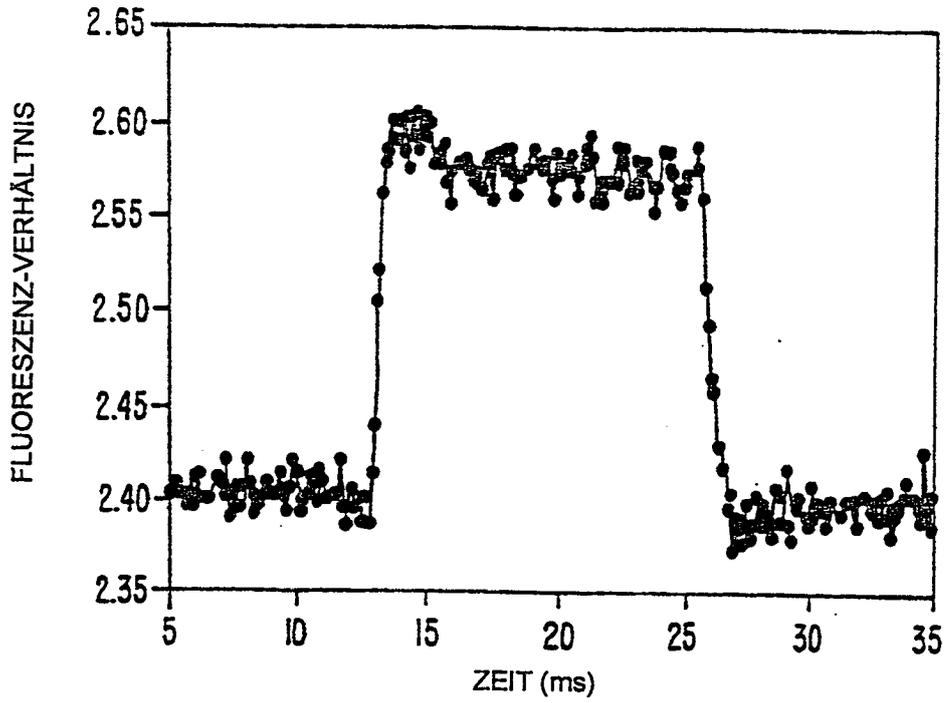


FIG. 22A.

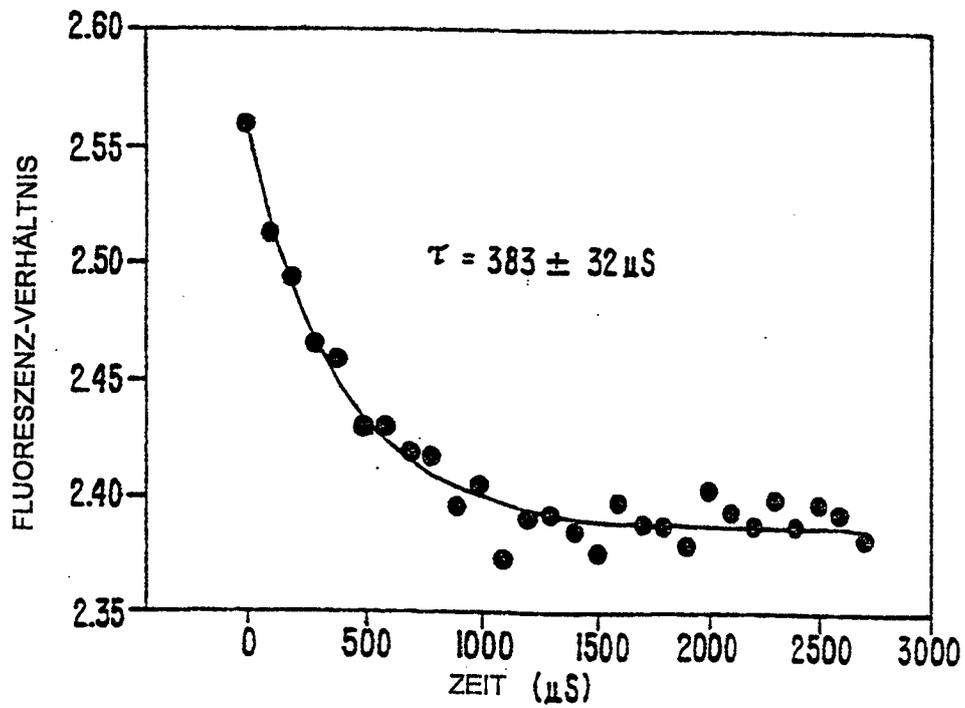


FIG. 22B.

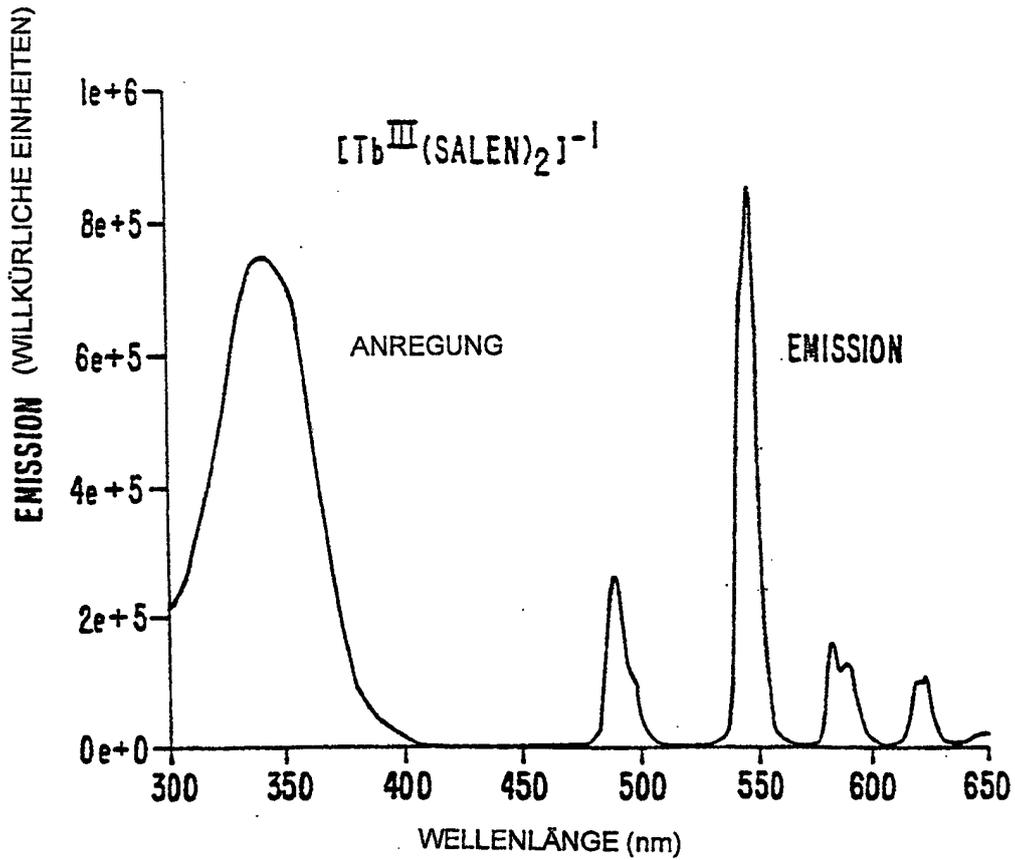


FIG. 23A.

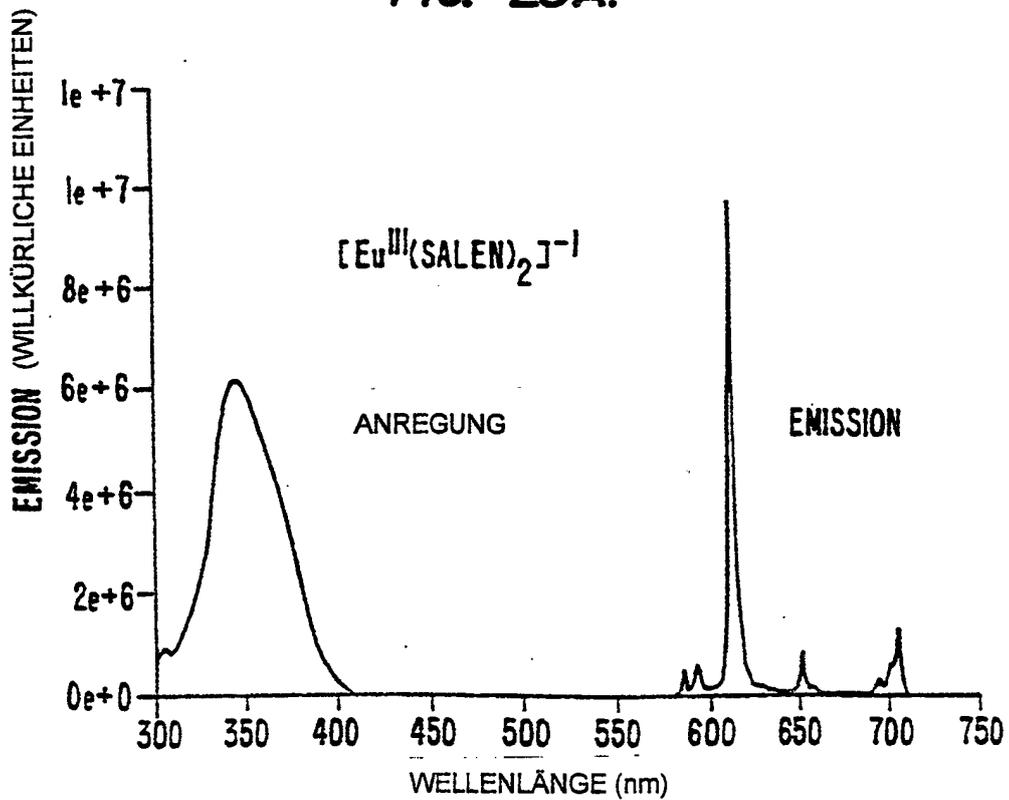


FIG. 23B.