



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 26 151 T2 2009.05.28**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 421 206 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12Q 1/02 (2006.01)**  
**G01N 33/52 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 26 151.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US02/25046**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 759 289.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/014701**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.08.2002**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **20.02.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.05.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.05.2009**

(30) Unionspriorität:  
**924797 08.08.2001 US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(73) Patentinhaber:  
**MDS Analytical Technologies (US) Inc.,  
Sunnyvale, Calif., US**

(72) Erfinder:  
**KLAUBERT, Dieter, Arroyo Grande, CA 93420, US;  
DIWU, Zhenjun, Sunnyvale, CA 94087, US; YI,  
Guoliang, Sunnyvale, CA 94087, US; KIRK, Martin,  
San Carlos, CA 94070, US**

(74) Vertreter:  
**Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München**

(54) Bezeichnung: **VERBESSERTES VERFAHREN ZUR MEMBRANPOTENTIALMESSUNG**

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

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### Hintergrund der Erfindung

#### Bereich der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Bereiche Biologie und Chemie sowie bioanalytische Messtechnik. Insbesondere ist die vorliegende Erfindung gerichtet auf eine Zubereitung und Verfahren zur Verwendung beim Ermaßen von Membran-Potentialen, speziell in biologischen Systemen. Potentiometrische optische Sonden machen es möglich, dass Forscher Membranpotential-Messungen in Organellen und in Zellen durchführen, die zu klein sind, um die Verwendung von Mikroelektroden zu erlauben. Darüber hinaus können in Verbindung mit Bildgebungs-Verfahren diese Sonden dazu verwendet werden, Variationen beim Membran-Potential in anregbaren Zellen und durch Perfusion durchströmten Organen mit räumlicher Auflösung und Probeentnahme-Frequenz aufzuzeichnen, die bei Verwendung von Mikroelektroden schwierig zu erhalten sind.

#### Hintergrund des Standes der Technik

**[0002]** Die Plasma-Membran einer Zelle hat typischerweise ein Transmembran-Potential von angenähert  $-70$  mV (negativer Bereich im Innern) als Folge von  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Cl^-$ -Konzentrations-Gradienten, die durch aktive Transportprozesse aufrechterhalten werden. Potentiometrische Sonden bieten ein indirektes Verfahren zum Bestimmen der Translokation dieser Ionen. Anstiege und Senkungen des Membran-Potentials (bezeichnet als „Membran-Hyperpolarisation“ und „Membran-Depolarisation“) spielen eine zentrale Rolle in vielen physiologischen Prozessen, einschließlich der Nervenimpuls-Fortleitung, Muskel-Kontraktion, Zell-Signalgebung und Schließen von Ionen-Kanälen (Druckschriften (1) bis (3)). Potentiometrische Sonden sind wichtige Werkzeuge zum Studieren dieser Prozesse, wie auch für eine Abschätzung der Zell-Überlebensfähigkeit. Potentiometrische Sonden schließen kationische oder zwitterionische Styryl-Farbstoffe, die kationischen Carbocyanine und Rhodamine, die anionischen Oxonole und Hybrid-Oxonole sowie Merocyanin 540 ein (Druckschriften (4) bis (8)). Die Klasse von Farbstoffen bestimmt Faktoren wie beispielsweise eine Ansammlung in Zellen, einen Response-Mechanismus sowie die Toxizität. Mechanismen zum optischen Erfassen von Membran-Potentialen wurden traditionell in zwei Klassen unterteilt: Eine empfindliche, jedoch langsame Umverteilung von permanenten Ionen vom extrazellulären Medium in die Zelle, und eine schnelle, jedoch in geringem Umfang auftretende Perturbation von relativ schlecht durchgänglichen Farbstoffen, die an eine Seite der Plasma-Membran befestigt sind (Druckschriften (2) und (3)).

**[0003]** Die Bis-barbitursäure- und -thiobarbitursäure-Oxonole, oft bezeichnet als „DiBAC-Farbstoffe“ bzw. „DiSBAC-Farbstoffe“, bilden eine Familie von spektral unterscheidbaren potentiometrischen Sonden mit Anregungsmaxima, die den größten Teil des Bereichs sichtbarer Wellenlängen abdecken.  $DiBAC_4(3)$  und  $DiSBAC_2(3)$  waren die beiden am meisten populären Oxonol-Farbstoffe für Membran-Potential-Messungen (Druckschriften (9) und (11)). Diese Farbstoffe treten in depolarisierte Zellen ein, wo sie sich an intrazelluläre Proteine oder Membranen binden und eine verstärkte Fluoreszenz und Verschiebungen in dem roten Spektralbereich zeigen. Eine erhöhte Depolarisation führt zu einem stärkeren Einfließen des anionischen Farbstoffs und damit zu einer Erhöhung der Fluoreszenz. Soweit berichtet wird, hat  $DiBAC_4(3)$  die höchste Spannungsempfindlichkeit. Das bei langer Wellenlänge reagierende  $DiSBAC_2(3)$  wurde häufig in Kombination mit dem durch UV-Licht anregbaren  $Ca^{2+}$ -Indikatoren Indo-1 oder Fura-2 für gleichzeitige Messungen des Membran-Potentials und der  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen verwendet. Wechselwirkungen zwischen anionischen Oxonolen und dem kationischen  $K^+$ -Valinomycin-Komplex komplizieren die Verwendung dieses Ionophors zum Kalibrieren von potentiometrischen Responses. DiBAC- und DiSBAC-Farbstoffe werden von Mitochondrien aufgrund ihrer insgesamt negativen Ladung ausgeschlossen, was sie bei einer Messung von Plasma-Membran-Potentialen überlegen gegenüber Carbocyaninen macht.

**[0004]** Allgemein war vorgeschlagen worden, dass DiBAC- und DiSBAC-Farbstoffe, die längere Alkyl-Ketten tragen, bessere Eigenschaften zum Messen von Membran-Potentialen aufweisen (Druckschriften (5) und (12)).  $DiSBAC_6(3)$  war zur Verwendung in einem Membran-Potential-Assay auf FREI-Basis ausgewählt worden (Druckschrift (12)). Es gibt keine Berichte über  $DiBAC_1$  und  $DiSBAC_1$  zur Messung von Membran-Potentialen.

**[0005]** Die Druckschrift WO 01/42,211 ist gerichtet auf Verfahren zum Nachweis von Änderungen im Potential von Membranen biologischer Systeme. Die Verfahrensweisen können Gebrauch von einem Polymethin-Oxonol machen, dessen Stickstoffe unabhängig an daran angehängte Einheiten gebunden sind, die gewählt sind

aus H, Hydrocarbyl und Heteroalkyl.

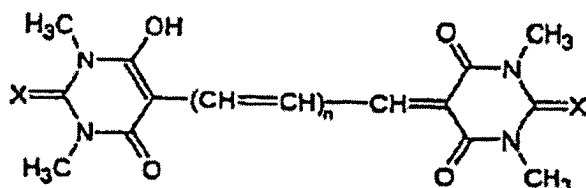
**[0006]** Die Druckschrift GB 2,136,590 betrifft Zusammensetzungen, die einen bleichbaren Farbstoff enthalten, der bei Belichtung mit Strahlung ausgewählter Wellenlängen innerhalb des allgemeinen Bereichs von 200 bis 1.100 nm und/oder bei Erhitzen gebleicht werden können. Insbesondere betrifft die Druckschrift GB 2,136,590 Zubereitungen, die einen bleichbaren Farbstoff in reaktiver Verbindung mit einer mesoionischen Verbindung enthalten, z. B. einen Sydnon, und die Verwendung solcher Zubereitungen als photo- und/oder wärmeempfindliche Schicht in einem Bildaufzeichnungs-Element, wie einer Anti-Halogenierungs-Schicht oder als Flüssig-Actinometer.

**[0007]** Die Druckschrift GB 1,231,884 betrifft photographische Materialien, die eine Antihalogenierungs- oder Filterschicht enthalten, wobei die Schicht als Farbstoff ein Silbersalz eines Tri- und/oder Penta-Methin-Oxonols einer Thiobarbitursäure umfasst.

**[0008]** Es wurde entdeckt, dass DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiSBAC<sub>1</sub>(3) unerwartete Eigenschaften besitzen, die zur Messung von Membran-Potentialen mit FLIPR und anderen Fluoreszenz-Vorrichtungen verwendet werden können. Verglichen mit anderen Mitgliedern der DiBAC- und DiSBAC-Familie ergeben DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiSBAC<sub>1</sub>(3) ein stärkeres Signal und eine schnellere Response in Ergänzung zu einer besseren Wasserlöslichkeit.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0009]** Die Erfindung umfasst ein verbessertes Verfahren zur Messung des Membran-Potentials unter Verwendung von Verbindungen der Formel (I) als potentiometrische Sonden. Diese Sonden können verwendet werden in Kombination mit anderen Fluoreszenz-Indikatoren, wie beispielsweise Indo-1, Flura-2 und Fluo-3, Calcium-Grün oder Fluo-4. Solche Sonden können verwendet werden in Mikroplatten-Lese-Vorrichtungen wie beispielsweise FLIPR, Fluoreszenz-Bild-Platten-Lesern, wie sie vertrieben werden von der Firma Molecular Device Corp. aus Sunnyvale, CA; Durchfluss-Cytometern und Fluorometern. Solche Sonden werden verwendet zum Messen des Membran-Potentials in lebenden Zellen.



worin X für O oder S steht, n für 1 oder 2 steht.

#### I

**[0010]** Die Erfindung umfasst auch Test-Kits, die Reagenzien von Verbindung (I), Verbindung (I) in Kombination mit einem anderen Fluoreszenz-Reagenz und insbesondere Fluoreszenz-Indikatoren wie beispielsweise Indo-1, Flura-2, Fluo-3, Calcium-Grün oder Fluo-4 enthalten.

**[0011]** Ein anderer Aspekt der Erfindung schließt ein ein Verfahren zum Erzeugen spannungsempfindlicher Fluoreszenz-Änderungen, das umfasst ein Inkubieren der Membran mit:

- einem ersten Reagenz, das ausgewählt ist aus den potentiometrischen Sonden, die sich von einer Seite der Membran zu der gegenüberliegenden Seite in Response auf ein Transmembran-Potential umverteilen, und ein zweites Reagenz, das gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Nicht-Fluoreszenz-Farbstoffen oder Pigmenten, die nicht Membran-gängig sind, und die eine Energie-Übertragung mit dem ersten Reagenz auf einer Seite der Membranen unter Reduzieren oder Eliminieren des Fluoreszenz-Signals auf der Seite eingehen; oder
- einem ersten Reagenz, das gewählt ist aus den potentiometrischen Sonden, die sich von einer Seite der Membran zu der gegenüberliegenden Seite in Response auf ein Transmembran-Potential umverteilen; und einem zweiten Reagenz, das gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Nicht-Fluoreszenz-Farbstoffen oder Pigmenten, die nicht Membran-gängig sind und das Anregungs-Licht oder die Emission von dem ersten Reagenz auf einer Seite der Membran absorbieren und so das unerwünschte Fluoreszenz-Signal reduzieren oder eliminieren; oder
- einem ersten Reagenz, das gewählt ist aus den potentiometrischen Sonden, die sich von einer Seite der Membran zu der gegenüberliegenden Seite in Response auf ein Transmembran-Potential umverteilen; und einem zweiten Reagenz, das gewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus Fluoreszenz- oder Lumineszenz-

senz-Sonden, die eine Energie-Übertragung mit dem ersten Reagenz eingehen, wobei das zweite Reagenz in Nachbarschaft zu entweder der einen Seite oder der anderen Seite der Membran angeordnet ist.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

[0012] [Fig. 1](#) ist ein Reaktionsschema zur Herstellung von DiBAC und DiSBAC.

[0013] [Fig. 2](#) veranschaulicht die spannungsabhängigen Fluoreszenz-Intensitäts-Änderungen von DiSBAC<sub>1</sub>(3) in P2X2-Zellen bei verschiedenen ATP-Konzentrationen.

[0014] [Fig. 3](#) veranschaulicht die Absorptionsspektren von DiSBAC<sub>1</sub>(3), DiSBAC<sub>2</sub>(3), DiSBAC<sub>3</sub>(3), DiSBAC<sub>4</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiBAC<sub>4</sub>(3) in 1:1 Methanol/Wasser.

[0015] [Fig. 4](#) veranschaulicht die Fluoreszenz-Spektren von DiSBAC<sub>1</sub>(3), DiSBAC<sub>2</sub>(3), DiSBAC<sub>3</sub>(3), DiSBAC<sub>4</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiBAC<sub>4</sub>(3) in 1:1 Methanol/Wasser.

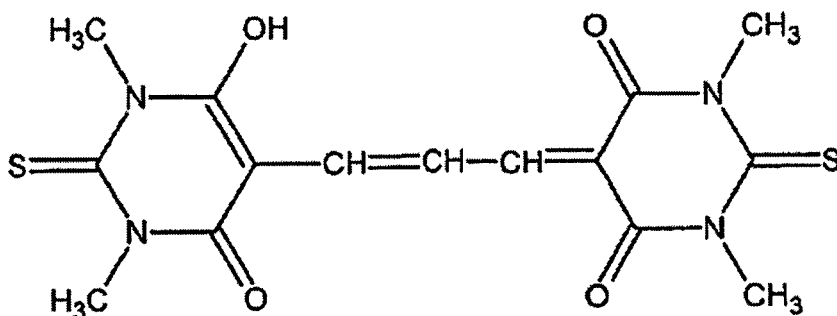
#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0016] Verbindungen, die bei der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, werden hergestellt nach Verfahrensweisen, die beschrieben wurden von G. W. Fischer, in „Chem. Ber., 1969, 102: 2609–2620“, wie sie in [Fig. 1](#) gezeigt sind.

[0017] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht:

#### Beispiel 1

##### Herstellung von DiSBAC<sub>1</sub>(3)



[0018] Die Farbstoffe DiBAC und DiSBAC wurden hergestellt auf der Basis der Verfahrensweise für die Ethyl- und Butyl-Derivate (H. Bartsch und G. Haubold, Arch. Pharm. 1982, 315, 761–766). Speziell wurden Malonaldehyd-bis(phenylimin-)monohydrochlorid (2,6 g, 10 mMol) und 1,3-Dimethyl-2-thiobarbitursäure (3,5 g, 20 mMol) in Acetonitril (40 ml) gelöst. Der Lösung wurde Triethylamin (2 g, 20 mMol) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde am Rückfluss behandelt, bis die Ausgangsmaterialien vollständig verbraucht waren, die durch TLC (Dünnschichtchromatographie) angezeigt wurde. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und wurde in saures Wasser gegossen (pH-Wert 2–3, 350 ml). Die resultierende Suspension wurde filtriert, um den Feststoff aufzufangen, der mit kaltem Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet wurde. Das Rohprodukt wurde weiter auf einer Silicagel-Säule unter Verwendung eines Gradienten aus Dichlormethan/Methanol gereinigt und ergab das gewünschte Produkt.

[0019] DiSBAC<sub>1</sub>(5), DiBAC<sub>1</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(5) und andere Oxonol-Farbstoffe wurden analog der obigen Verfahrensweise hergestellt.

#### Beispiel 2

Messung von Membran-Potentialen unter Verwendung von DiSBAC<sub>1</sub>(3) in Kombination mit dem Fluoreszenz-Bild-Platten-Leser (FLIPR™)

[0020] Dieses spezielle Beispiel veranschaulicht, wie man DiSBAC<sub>1</sub>(3) in P2X2-Zellen in Kombination mit einem FLIPR™ verwendet (Fluoreszenz-Bild-Platten-Leser, vertrieben von der Firma Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). P2X2-Zellen waren 1.321 N1-Astrocytom-Zellen, die transfektiert worden waren, um den

durch den purinergischen P2X<sub>2</sub>-Liganden versperrten Ionen-Kanal zu überexprimieren. P2X<sub>2</sub> gehört zu einer Klasse von purinergischen Ionen-Kanälen, die Calcium und Natrium in Response auf Purin passieren lassen, einschließlich Adenosin-5'-triphosphat (ATP). P2X<sub>2</sub>-Zellen wurden fortgepflanzt und gehalten in DME (hoher Glucose-Gehalt), 10% FCS, 1 X Pen/Strep und 2 mM L-Glutamin. Die Verdopplungs-Zeit beträgt etwa 36 Stunden. Bei Konfluenz sollten die P2X<sub>2</sub>-Zellen in einem Verhältnis 1:2 gesplittet werden. Die Zellen sollten für nicht mehr als 20 Passagen beibehalten werden. Bei Annäherung an diesen Grenzwert sollte ein neues gefrorenes Reagenzglas mit Zellen aufgetaut werden. Es folgt nachfolgend ein typisches Kit-Verfahren:

1. Ausplattieren von 40.000 P2X<sub>2</sub>-Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l pro Vertiefung bei Platten von 96 Vertiefungen oder von 10.000 P2X<sub>2</sub>-Zellen in einem Volumen von 25  $\mu$ l pro Vertiefung bei Platten mit 384 Vertiefungen über Nacht;
2. Herstellung von 1X-Beladungs-Puffer;
  - 2.1 zur Herstellung von 1X-Assay-Puffer: Einpipettieren von 10 ml 10X Reagenzpuffer (1X Hanks' Balanced Saline Solution + 20 mM HPEPES, pH-Wert 7,40) und Verdünnen in 90 ml destillierten Wassers; Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 unter Verwendung von 1,0 N NaOH und/oder 1,0 N HCl;
  - 2.2 zur Herstellung einer 10 mM Vorratslösung von DiSBAC<sub>1</sub>(3): Lösen von 3,8 mg DiSBAC<sub>1</sub>(3) in 1 ml DM-SO;
  - 2.3 zur Herstellung einer 10%igen Pluronsäure: Lösen von 400 mg Pluronsäure in 4 ml Wasser; Erhitzen auf 37°C zum Vervollständigen des Lösens.
  - 2.4 zur Herstellung von 1X-Beladungspuffer: Zugabe von 30  $\mu$ l einer Vorratslösung von DiSBAC<sub>1</sub>(3), 8  $\mu$ l 10%ige Pluronsäure und 20,0 mg DB71 in dem 1X FLIPR-Test-Puffer.
3. Beaufschlagen der Zellen mit 1X-Beladungspuffer;
4. Entfernen der Zellplatten von dem Inkubator;
5. Zugabe von 100  $\mu$ l von 1X-Beladungspuffer pro Vertiefung (bei Platten mit 96 Vertiefungen) oder 25  $\mu$ l Puffer pro Vertiefung (bei Platten mit 384 Vertiefungen);
6. Inkubieren der Platten bei 37°C für 30 min;
7. Durchführen des FLIPR-Membran-Potential-Assays;
  - 7.1 Herstellen einer 5X-Verbindungsplatte vor der Durchführung des FLIPR-Assays: Lösen von 27,5 mg ATP (Firma Sigman Cat, #A3377) in 1 ml sterilen Wassers unter Herstellen einer 50 mM Vorratslösung; Herstellen passender Verdünnungen für 100 nM, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M und Übertragen eines Minimums von 200  $\mu$ l in jede Vertiefung einer Verbindungsplatte;
  - 7.2 Sicherstellen, dass ein Membran-Potential-Filter installiert ist; Anwählen von p2x2-fc für Experimental-Set-up der FLIPR-Software; Einsetzen der passenden Experimental-Parameter;
  - 7.3 nach Inkubierung: Überführung der Platten direkt in das FLIPR und Beginnen des Membran-Potential-Assays;
8. Durchführung des FLIPR-Assays und Durchführen der Daten-Analyse:

Die ATP-Dosis-Response-Kurve sollte ähnlich aussehen wie die Kurve, die in [Fig. 2](#) gezeigt ist: ein anfängliches Depolarisations-Ereignis, das als Erhöhung der Fluoreszenz abgebildet ist, gefolgt von einer Repolarisation oder einem Rückgang des Signals nahezu zur Grundlinie. Auch sollte der EC<sub>50</sub>-Wert etwa im Bereich von 10 bis 100 nM liegen.

### Beispiel 3

Messen von Membran-Potentialen unter Verwendung von DiBAC<sub>1</sub>(3) in Kombination mit einem Mikroskop

**[0021]** DiBAC<sub>1</sub>(3) wird zur Messung von Membran-Potential-Änderungen mit einem Mikroskop verwendet, entsprechend der Verfahrensweise, die beschrieben wurde von L. M. Loew (Methods in Cell Biology, Band 38, Seiten 195 bis 209).

### Beispiel 4

Messen von Membran-Potentialen unter Verwendung von DiBAC<sub>1</sub>(3) in Kombination mit einem Durchfluss-Cytometer

**[0022]** DiBAC<sub>1</sub>(3) wurde zur Messung von Membran-Potential-Änderungen mit einem Durchfluss-Cytometer gemäß der Verfahrensweise verwendet, die beschrieben wurde von H. M. Shapiro (Methods in Cell Biology, Band 41, Seiten 121 bis 133 (1994)).

## Beispiel 5

## Vergleich der Wasserlöslichkeit und Hydrophobizität von DiBAC- und DiSBAC-Farbstoffen

**[0023]** DiSBAC<sub>1</sub>(3), DiSBAC<sub>2</sub>(3), DiSBAC<sub>3</sub>(3), DiSBAC<sub>4</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden in DMSO gelöst (3 mM). Die DMSO-Vorratslösungen wurden jeweils in 1:1-Octanol-Wasser-Mischungen geschüttelt bzw. verteilt. Die Konzentrationen der Oxonol-Farbstoffe in den Octanol- und Wasser-Schichten wurden anhand von Absorptions-Spektren bestimmt. Die Ergebnisse sind summarisch in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst. Wie in der Tabelle gezeigt, sind DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiSBAC<sub>1</sub>(3) vielmehr hydrophil als die anderen Oxonol-Farbstoffe. Sie haben auch eine viel bessere Wasserlöslichkeit.

Tabelle 1

Verbindung	$\lambda_{\text{max}}$ in Octanol (nm)	Absorptionsvermögen in Wasser	Absorptionsvermögen in Octanol	Absorptionsvermögen in Wasser/Absorptionsvermögen in Octanol	Relative Werte
DiBAC <sub>1</sub> (3)	495	1,297	0,3104	4,179	1
DiBAC <sub>4</sub> (3)	497	0,002501	2,854	0,00088	0,00021
DiSBAC <sub>1</sub> (3)	538	0,06147	0,9126	0,0674	1
DiSBAC <sub>2</sub> (3)	543	0,01143	2,187	0,0052	0,078
DiSBAC <sub>3</sub> (3)	544	0,002256	4,331	0,0005	0,0077
DiSBAC <sub>4</sub> (3)	544	0,003318	3,226	<0,0010	<0,0077

## Beispiel 6

## Vergleich der Absorptionen von DiBAC- und DiSBAC-Farbstoffen

**[0024]** DiSBAC<sub>1</sub>(3), DiSBAC<sub>2</sub>(3), DiSBAC<sub>3</sub>(3), DiSBAC<sub>4</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden in Methanol gelöst (1 mM). Die Vorratslösungen wurden mit 1:1 Methanol/Wasser verdünnt, und die Absorptionsspektren wurden in einem Spektrophotometer aufgenommen. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt ist, besitzen DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiSBAC<sub>1</sub>(3) eine unerwartete Blauverschiebung, verglichen mit anderen Oxonol-Farbstoffen.

## Beispiel 7

## Vergleich der Fluoreszenz von DiBAC- und DiSBAC-Farbstoffen

**[0025]** DiSBAC<sub>1</sub>(3), DiSBAC<sub>2</sub>(3), DiSBAC<sub>3</sub>(3), DiSBAC<sub>4</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden in Methanol gelöst (1 mM). Die Vorratslösungen wurden mit 1:1 Methanol/Wasser verdünnt, und die Absorptionsspektren wurden in einem Fluorometer aufgezeichnet. Wie in [Fig. 4](#) gezeigt, besitzen DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiSBAC<sub>1</sub>(3) unerwartete Blau-Verschiebungen, verglichen mit den anderen Oxonol-Farbstoffen.

## Beispiel 8

## Fluoreszenz-Response-Vergleich von DiBAC- und DiSBAC-Farbstoffen zum Ermessen von Membran-Potentialen in FLIPR-Assays

**[0026]** DiSBAC<sub>1</sub>(3), DiSBAC<sub>2</sub>(3), DiSBAC<sub>3</sub>(3), DiSBAC<sub>4</sub>(3), DiBAC<sub>1</sub>(3) und DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden in DMSO gelöst (1 mM). Die Vorratslösungen wurden jeweils verwendet, um Membran-Potential-Änderungen in den P2X2-Zellen zu testen, und zwar in Kombination mit FLIPR™, wie dies in Beispiel 2 beschrieben wurde. Die Ergebnisse sind summarisch in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2

Verbindungen	Fluoreszenz-Verstärkung bei ATP-Stimulierung (10 µM) (x-fach)	Response-Geschwindigkeit
DiBAC <sub>1</sub> (3)	3,7	schnell
DiBAC <sub>4</sub> (3)	3,3	langsam
DiSBAC <sub>1</sub> (3)	108,5	schnell
DiSBAC <sub>2</sub> (3)	38,6	mäßig
DiSBAC <sub>3</sub> (3)	14,5	langsam
DiSBAC <sub>4</sub> (3)	2,3	langsam

**[0027]** Wie in der Tabelle 2 gezeigt ist, ist DiSBAC<sub>1</sub>(3) viel empfindlicher und weist eine schnellere Response auf Membran-Potential-Änderungen auf als die restlichen DiSBACs. DiBAC<sub>1</sub>(3) hat ebenfalls eine viel schnellere Response auf Membran-Potential-Änderungen als DiBAC<sub>4</sub>(3).

## Beispiel 9

Verwendung von DiSBAC<sub>1</sub>(3) als Fluoreszenz-Indikator des Transmembran-Potentials

## Depolarisation von PC 12-Zellen

**[0028]** Protokolle für Transmembran-Potential-Messungen werden kurz summarisch aufgeführt, da sie denjenigen ähnlich sind, die oben detailliert in Beispiel 2 angegeben wurden. Das Fluoreszenz-Reagenz Bis(1,3-dimethylthiobarbitursäure)-trimethin-oxonol, [DiSBAC<sub>1</sub>(3)], kann käuflich von der Firma Molecular Probes (Eugene, OR, USA) erworben werden. Der 1X-Zell-Beladungspuffer für DiSBAC<sub>2</sub>(3) besteht aus natriumfreiem Tyrode-Puffer (SFTB), 2,5 µM DiSBAC<sub>1</sub>(3) und 200 µM Direkt-Blau 71 (als Fluoreszenz-Quencher).

**[0029]** Die Ratten-Pheochromocytom-Klonierungs-Zelllinie (Nebennierenrinde), PC 12, wurde in RPMI 1640-Kulturmedium mit 10% fetalem Kalbserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin (PS), 2 mM L-Glutamin und

1 mM Natriumpyruvat gezüchtet. Die Zellen wurden in Suspension gezüchtet und anschließend von dem Wachstums-Medium abzentrifugiert und in DiSBAC<sub>2</sub>(3), 1X-Zell-Beladungspuffer resuspendiert. Etwa 100.000 Zellen wurden pro Vertiefung in einer 96 Vertiefungen umfassenden Mikrotiter-Platte ausplattiert, die vorbe-schichtet worden war mit Poly-D-Lysin, um die Zell-Haftung zu verstärken, wurden bei 1.000 Upm 4 min lang zentrifugiert und in einen Inkubator für weitere 20 min gegeben. Die Zellen wurden nicht mit irgendeinem flüs-sigen Medium gewaschen, noch wurde der 1X-Zell-Beladungspuffer vor der Durchführung von Fluores-zenz-Messungen entfernt.

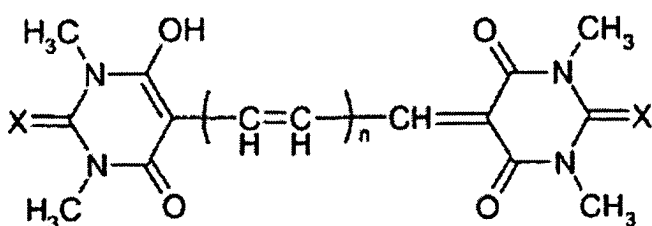
**[0030]** Die fluoreszenzmäßig markierten Zellen wurden auf Änderungen des Membran-Potentials unter Ver-wendung eines FLIPR<sup>TM</sup>-Fluoreszenz-Bild-Platten-Lesers analysiert. Kurz gesagt, wurden die Zellen durch Zu-gabe von 75 mM Kaliumgluconat in Natrium enthaltendem Tyrode-Puffer (SCTB) depolarisiert. Zum Inhibieren spannungsverschlossener Kalium-Kanäle wurden die Zellen vorher mit 100 µM Tetrodotoxin (TTX) für die Zeit von 5 min vor einer Depolarisation inkubiert. Die Daten legen offen, dass eine Zell-Depolarisation (aufgrund einer Kalium-Zugabe) eine erhöhte DiSBAC<sub>1</sub>(3)-Fluoreszenz hervorruft. Eine Inhibierung von Natrium-Kanälen durch TTX führt zu kleineren Änderungen des Membran-Potentials bei Kalium-Zugabe, wie angezeigt wird durch einen kleineren Anstieg der Fluoreszenz, verglichen mit der positiven Kontrolle (75 mM Kaliumgluconat ohne TTX).

#### Druckschriften

- Zochowski M, Wachowiak M, Falk CX, Cohen LB, Lam YW, Antic S., Zecevic D., Imaging membrane poten-tial with voltage-sensitive dyes. *Biol Bull* 198, 1–21 (2000).
- Plasek J, Sigler K, Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different, approaches to probe response analysis. *J Photochem Photobiol B* 33, 101–124 (1996).
- Loew LM., Characterization of Potentiometric Membrane Dyes. *Adv Chem Ser* 235, 151 (1994).
- Wu J-Y, Cohen LB., Fast Multisite Optical Measurement of Membrane Potential. In *Fluorescent and Lumi-nescent Probe for Biological Activity*, Mason WT, Ed., pp. 389–404 (1993).
- Loew LM., Potentiometric Membrane Dyes. In *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Mason WT, 2<sup>nd</sup> Ed. Pp. 210–221 (1999).
- Smith JC., Potential-sensitive molecular probes in membranes of bioenergetic relevance. *Biochim Biophys Acta* 1016, 1–28 (1990).
- Gross D, Loew LM., Fluorescent indicators of membrane potential: microspectrofluorometry and imaging. In *Methods Cell Biol* 30, 193–218 (1989).
- Freedman JC, Novak TS. Optical measurement of membrane potential in cells, organelles, and vesicles. *Me-thods Enzymol* 172, 102–122 (1989)
- Bronner C, Landry Y. The use of the potential-sensitive fluorescent probe bisoxonol in mast cells. *Biochim Biophys Acta* 1070, 321–331 (1991).
- Shapiro HM. Cell membrane potential analysis. *Methods Cell Biol* 41, 121–133 (1994).
- Loew LM. Confocal microscopy of potentiometric fluorescent dyes. *Methods Cell Biol* 38, 195–209 (1993).
- Gonzalez JE, Tsien R. Y. Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer. *Chem Biol* 4, 269–277 (1997).

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung von Transmembran-Potential-Änderungen in einer biologischen Zelle, welches Gebrauch macht von einer Verbindung von Struktur I als potentiometrischer Sonde:



I

worin X für O oder S steht; n für 1 oder 2 steht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend:

- (a) In-Kontakt-Bringen einer Verbindung von Struktur I mit einer Zell-Membran;
- (b) Stimulieren von Membran-Potential-Änderungen auf physikalischem Weg oder mit einer biologisch aktiven Substanz; und
- (c) Messen der Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Änderungen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die potentiometrische Sonde zum Messen von Transmembran-Potential-Änderungen in Kombination mit einem zweiten gefärbten Reagenz verwendet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin eine Verbindung gemäß Struktur I in Kombination mit einem zweiten Fluoreszenz-Indikator verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin der zweite Fluoreszenz-Indikator ist: Indo-1, Fura-2 und Fluo-3, Calcium-Grün oder Fluo-4.

6. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, worin die Membran eine Plasma-Membran einer biologischen Zelle ist.

7. Verfahren nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, worin die Messung in einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Leser vorgenommen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin der Fluoreszenz-Mikroplatten-Leser ein fluorometrischer Platten-Leser ist, der ein integriertes Pipettierungs- und Strömungstechnik-System aufweist.

9. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, worin die Messung mit einem Fluoreszenz-Strömungs-Cytometer durchgeführt wird.

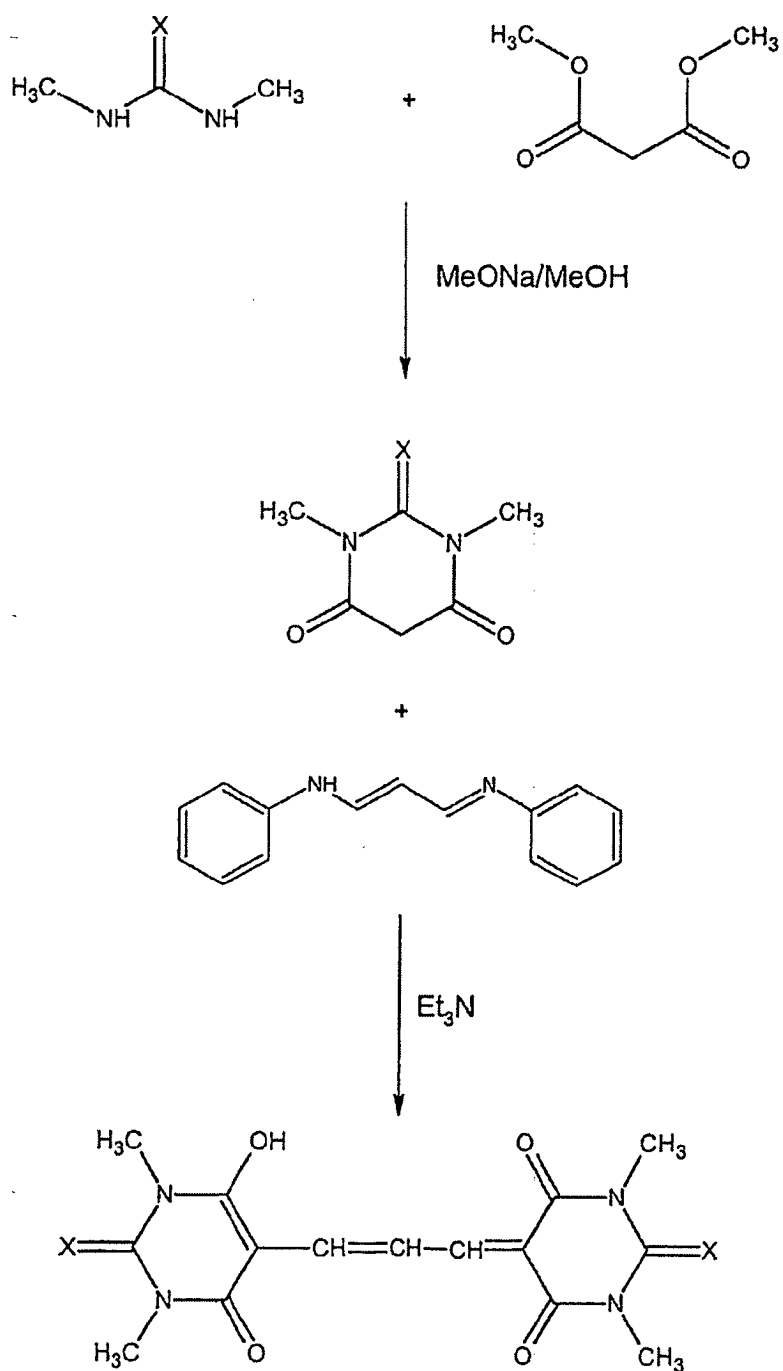
10. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, worin die Messung in einem Fluoreszenz-Mikroskop durchgeführt wird.

11. Test-Kit zur Messung von Membran-Potential-Änderungen, umfassend eine Verbindung der Struktur I als erstes Reagenz und ein zweites Reagenz, das gewählt ist aus Indo-1, Flura-2, Fluo-3, Calcium-Grün und Fluo-4.

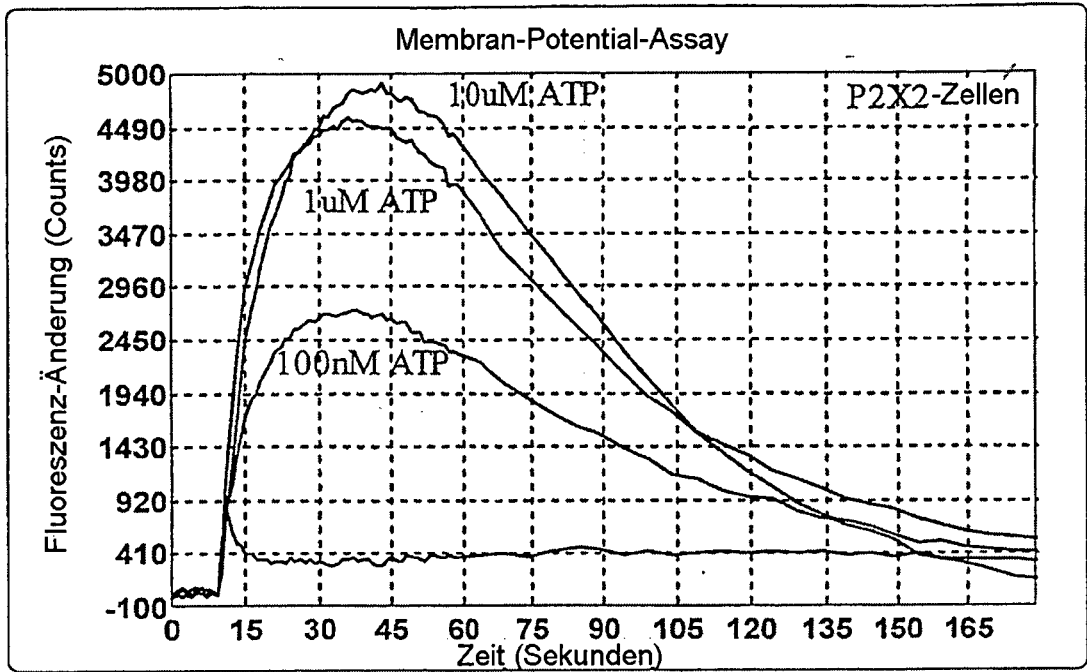
12. Test-Kit nach Anspruch 11, umfassend weiter ein nicht-fluoreszierendes gefärbtes Reagenz.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

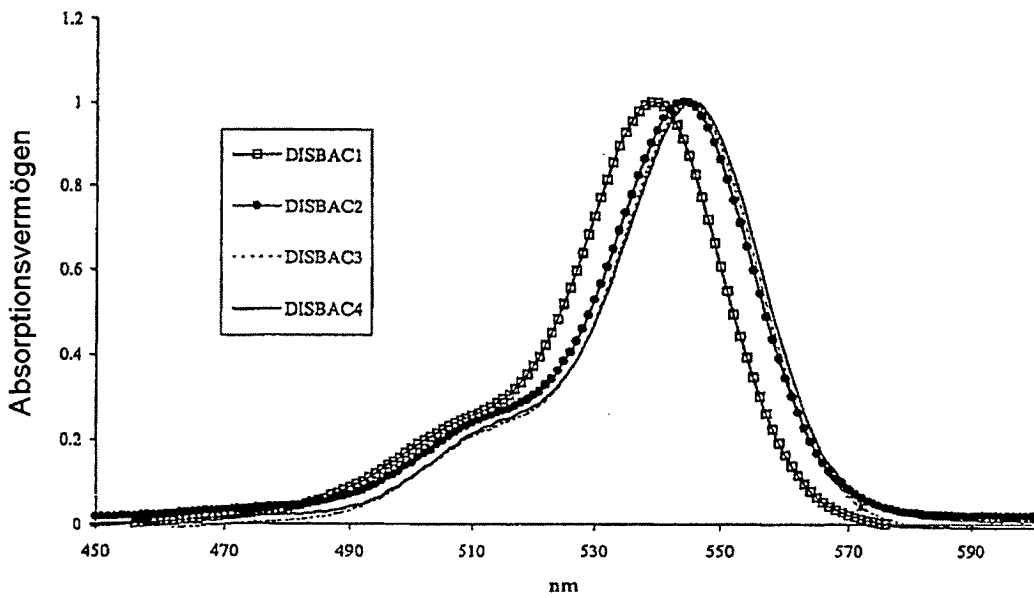
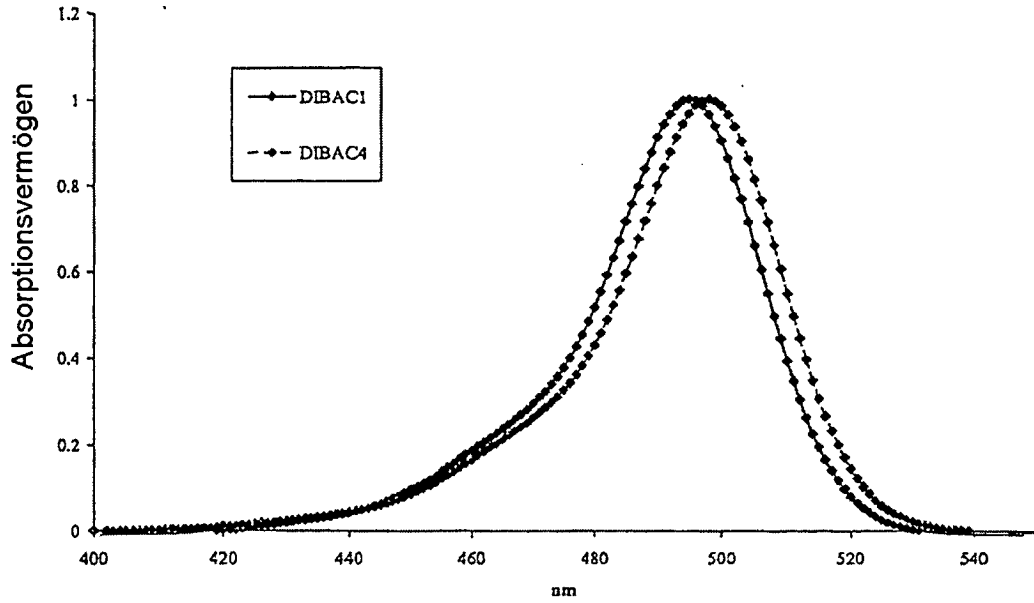
## Anhängende Zeichnungen



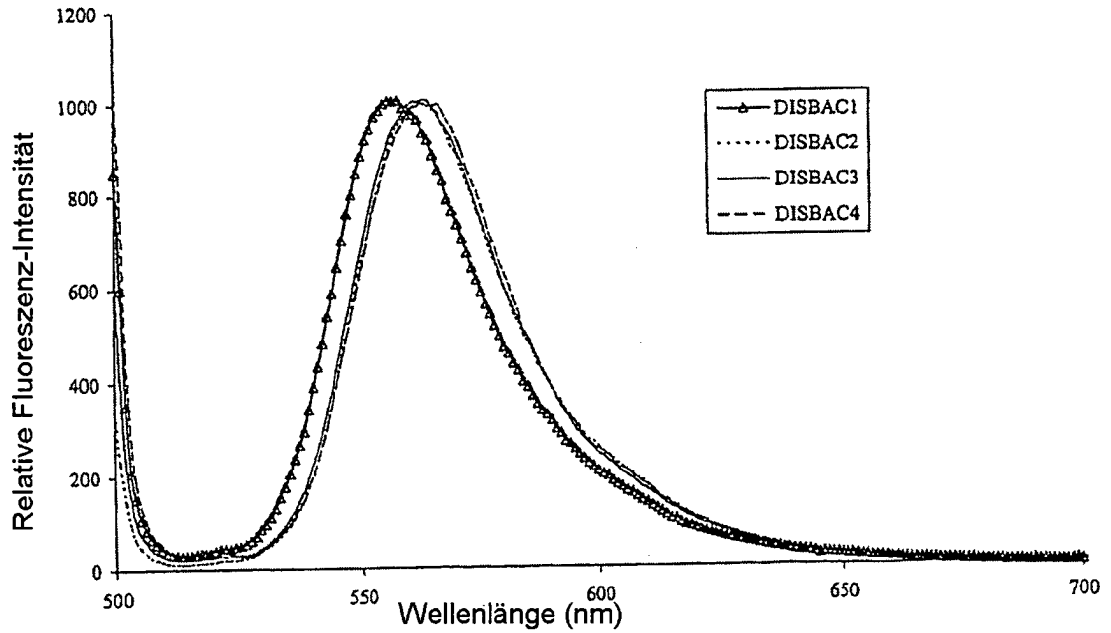
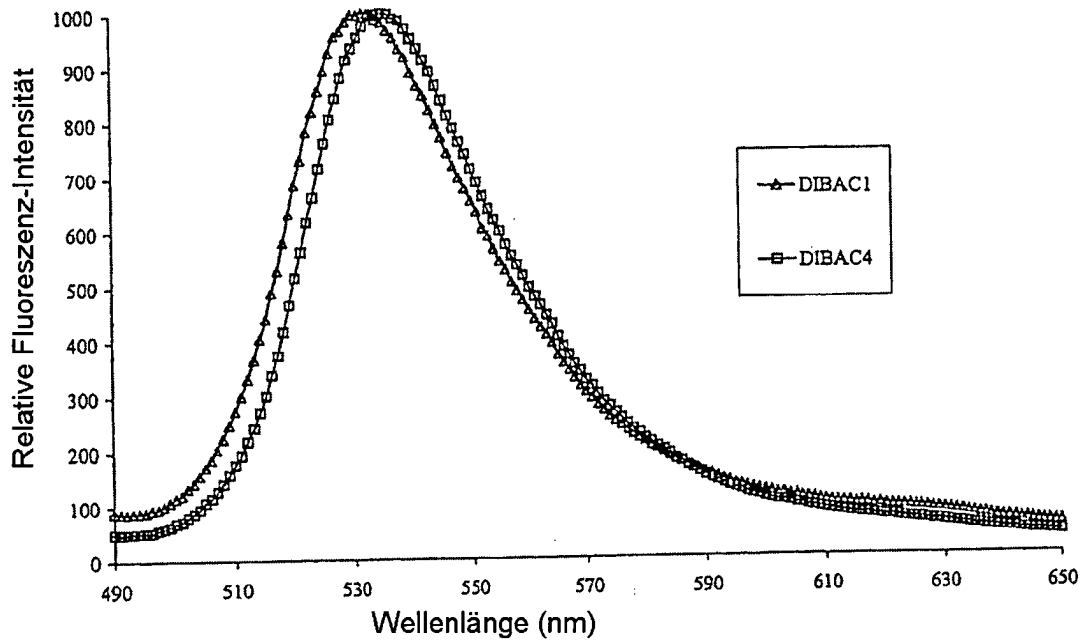
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4