

pH-schaltbare Vesikel aus einem von Serin abgeleiteten Guanidinio-carbonylpyrrol-Carboxylat-Zwitterion in DMSO**

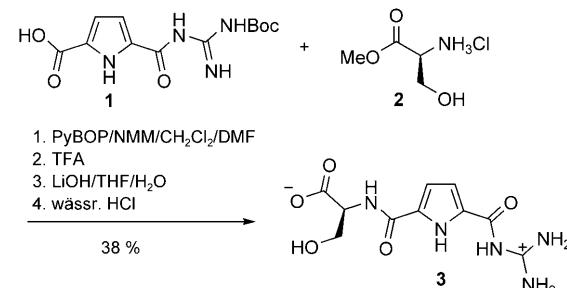
Fabian Rodler, Jürgen Linders, Tassilo Fenske, Thomas Rehm, Christian Mayer und Carsten Schmuck*

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem neuen Typus von Vesikeln, die durch Veränderung des Protonierungsgrads eines Zwitterions reversibel geöffnet und geschlossen werden können. Vesikel sind interessante Nanomaterialien mit potenzieller Anwendung beispielsweise als Transportsysteme in der gezielten Pharmakotherapie. Für diesen Verwendungszweck ist allerdings eine externe Steuerung der Vesikelbildung erforderlich. Bislang erfolgt die Vesikelbildung oft durch die Selbstassoziation amphiphiler Makromoleküle wie Lipidderivate oder Blockcopolymere.^[1,2] Unlängst wurde außerdem über formstabile Makrocyclen, Cyclodextrine oder kleine Peptiden als Grundeinheit für die Vesikelbildung berichtet.^[3] Ein Großteil dieser Moleküle sind klassische Amphiphile, deren Selbstassoziation vornehmlich auf hydrophoben und aromatischen Wechselwirkungen beruht.

Kürzlich präsentierten wir ein selbstkomplementäres von der Aminosäure Alanin abgeleitetes Guanidinocarbonylpyrrol-Carboxylat-Zwitterion als neuartigen Vesikelbildner. Mithilfe von NOESY-NMR-Experimenten, Rasterelektronenmikroskopie (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnten wir zeigen, dass dieses Zwitterion Ionenpaar-Dimere bildet, die in DMSO zu Vesikeln mit 40–50 nm Durchmesser aggregieren.^[4] Außerdem haben wir die H-Brücken-unterstützte Ionenpaarbildung zwischen dem Guanidinocarbonylpyrrol-Kation^[5] und einem Carboxylat bereits für den Aufbau unterschiedlicher Nanostrukturen wie Dimere,^[6] Schleifen^[7] und supramolekulare Polymere genutzt.^[8] Da die Guanidinocarbonylpyrrol-Einheit einen pK_s -Wert von ca. 6–7 aufweist, ist die Bildung eines Ionenpaares mit einem Carboxylat (pK_s ca. 3–5) nur in einem begrenzten pH-Bereich möglich. Dies wiederum bietet die Möglichkeit, die Ionenpaarbildung über den pH-Wert zu schalten (durch Wechsel vom neutralen in den sauren oder basischen Bereich).^[9] Aus diesem Grund wollten wir untersuchen, ob wir auch eine Vesikelbildung über den pH-Wert als externes Signal steuern können.^[10] Um diese Hypothese zu testen,

synthetisierten wir ein von der Aminosäure Serin abgeleitetes Guanidinocarbonylpyrrol-Carboxylat-Zwitterion (**3**) und untersuchten die Vesikelbildung sowohl auf einer Glimmeroberfläche durch AFM als auch in Lösung durch dynamische Lichtstreuung (DLS) und eine PFG-NMR-Methode. Diese NMR-Methode ermöglicht es, die eingekapselten Lösungsmittelmoleküle in den Vesikeln selektiv zu detektieren und zusätzlich Aussagen über die Permeabilität der Vesikelmembran zu treffen.^[11] Wir zeigen hier, dass es tatsächlich möglich ist, die Vesikelbildung des Zwitterions **3** über den Protonierungsgrad reversibel zu schalten. Außerdem haben wir gefunden, dass die Vesikelmembran sehr dicht und damit wenig durchlässig ist, sodass die Lösungsmittelmoleküle nur sehr langsam über die Membran hinweg austauschen.

Zur Synthese des Zwitterions **3** wurde zunächst L-Serin-methylester-Hydrochlorid (**2**) mit PyBOP in einer Mischung aus CH_2Cl_2 und DMF an die Boc-geschützte Guanidinocarbonylpyrrol-Carbonsäure **1**^[12] gekuppelt (67 % Ausbeute, Schema 1). Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA wurde der Methylester mit LiOH hydrolysiert und das Zwitterion **3** erhalten (57 % Ausbeute).



Schema 1. Synthese der Zwitterions **3**. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, DMF = *N,N*-Dimethylformamid, NMM = *N*-Methylmorpholin, PyBOP = Benzotriazol-1-yl-oxytritypyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat, TFA = Trifluoressigsäure, THF = Tetrahydrofuran.

Wie das bereits erwähnte Alanin-Zwitterion^[4] bildet auch das Zwitterion **3** Vesikel, wie durch AFM-Untersuchungen gezeigt werden konnte. Eine 5 mM Lösung von **3** in DMSO wurde durch Schleuderbeschichtung auf eine Glimmeroberfläche gebracht und im Kontaktmodus analysiert, wobei deformierte Vesikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 50 nm (auf halber Höhe der Partikel gemessen) und einer Höhe von ca. 1.75 nm beobachtet wurden (Abbildung 3). Vesikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 57 nm (5 mM) liegen auch in Lösung vor, wie durch dynamische Lichtstreuung (DLS) gezeigt wurde. Genauere

[*] F. Rodler, T. Fenske, Dr. T. Rehm, Prof. Dr. C. Schmuck
Institut für Organische Chemie, Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 7, 45141 Essen (Deutschland)
Fax: (+49) 201-183-3097
E-Mail: carsten.schmuck@uni-due.de

J. Linders, Prof. Dr. C. Mayer
Institut für Physikalische Chemie, Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 5, 45141 Essen (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003405> zu finden.

Erkenntnisse über die Eigenschaften der Vesikel wurden durch ein PFG-NMR-Experiment erhalten.^[11] Diese Methode ermöglicht die Differenzierung von Molekülen bezüglich ihrer Diffusionseigenschaften. Aus Abbildung 1a ist klar ersichtlich, dass zwei verschiedene Fraktionen von DMSO-

Bewegung typischer Vesikel übereinstimmt. Über die Größe des Diffusionskoeffizienten lässt sich der durchschnittliche Vesikelradius unter Zuhilfenahme der Viskositätskonstante von DMSO (0.002 Nsm^{-2}) zu $r = 20\text{--}25 \text{ nm}$ bestimmen, was mit den erhaltenen Daten aus den DLS- und AFM-Experimenten gut übereinstimmt.

Aus den PFG-NMR-Experimenten konnten wir außerdem Informationen über die Permeabilität der Vesikelmembran erhalten. Wenn man den Abstand Δ zwischen zwei Gradientenpulsen vergrößert und man in den Bereich kommt, in dem die Austauschgeschwindigkeit der DMSO-Moleküle über die Membran hinweg liegt, so verschwindet das Echosignal für die eingeschlossenen DMSO-Moleküle.^[11] Die Messdaten zeigen allerdings bei einem Pulsabstand Δ zwischen 100 und 400 ms keinerlei Veränderung (Abbildung 1b). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in diesem Zeitfenster kein nennenswerter Austausch von DMSO-Moleküle über die Membran hinweg erfolgt. Vergleicht man die vom Zwitterion **3** gebildeten Vesikel mit anderen Systemen, so kann man feststellen, dass die Membran der Vesikel relativ undurchlässig für das Lösungsmittel ist. Bei einem ähnlichen Experiment, das kürzlich an verschiedenen Blockcopolymeren durchgeführt wurde, erhielt man durchschnittliche Verweildauern des Lösungsmittels (Wasser) im eingekapselten Zustand zwischen 68 und 250 ms.^[14] Die entsprechende Verweilzeit der DMSO-Moleküle ist in unserem Fall mindestens um eine Größenordnung länger, was einem sehr langsamen Austausch durch die Membran der Vesikel aus dem Zwitterion **3** entspricht.

Wenn man das NMR-Experiment auf die eingeschlossenen Lösungsmittelmoleküle fokussiert, kann man das Öffnen und Schließen der Vesikel bei der Zugabe von Säure oder Base beobachten. Stellt man die Gradientenstärke G so ein, dass $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) = 1.51 \times 10^{11} \text{ sm}^{-2}$ gilt, so beobachtet man im NMR-Spektrum nur ein Signal für das in den Vesikeln eingeschlossene DMSO. Die Beiträge aller anderen DMSO-Moleküle sind aufgrund der freien Diffusion bereits abgeklungen. Ein derartiges Spektrum der Originalvesikel von Zwitterion **3** ist in Abbildung 2a dargestellt. Das Signal bei $\delta = 2.5 \text{ ppm}$ stammt von den DMSO-Molekülen in den Vesikeln. Nach der Zugabe eines Äquivalents HCl (in Form einer

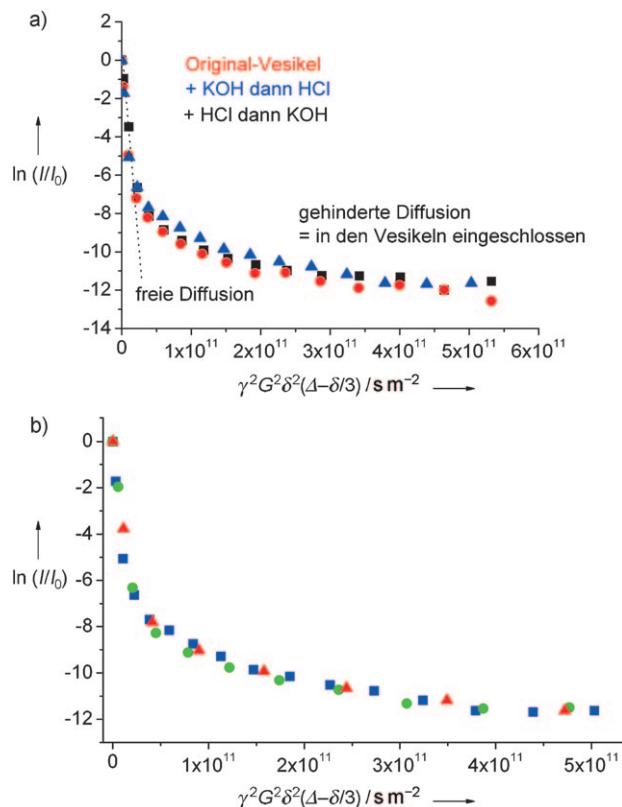


Abbildung 1. a) Logarithmische Auftragung der relativen Echointensität von DMSO gegen eine Funktion aus der Gradientenstärke G und dem Pulsabstand Δ . b) Logarithmische Auftragung der relativen Echointensität von DMSO bei einer Veränderung des Pulsabstands Δ (■ 100 ms, ● 200 ms, ▲ 300 ms).

Molekülen in Lösung vorliegen: frei diffundierende Moleküle und ein kleinerer Anteil mit eingeschränktem Diffusionsvermögen (die in den Vesikeln eingekapselten DMSO-Moleküle). Für eine ungehinderte Diffusion ergibt eine logarithmische Auftragung der relative Echointensität I/I_0 gegen den Parameter $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ eine Gerade mit einer Steigung, die dem negativen Selbstdiffusionskoeffizienten entspricht. Wie man in Abbildung 1a erkennt, ist dies bei einer 70 mM Lösung von **3** in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ für die überwiegende Mehrheit der DMSO-Moleküle bis zu einem Wert von $\ln(I/I_0) = -7$ der Fall. Im Bereich von $-7 > \ln(I/I_0) > -13$ beobachtet man aber einen zweiten, relativ flachen Kurvenbereich, der DMSO-Molekülen mit einer gehinderten Selbstdiffusion entspricht. Aus den Messdaten kann man ableiten, dass etwa 0.1% aller DMSO-Moleküle sich in diesem eingeschlossenen Zustand befinden.^[13] Die Steigung für diese DMSO-Moleküle nähert sich einem sehr kleinen Grenzwert von ca. $5 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$, was mit der Brownschen

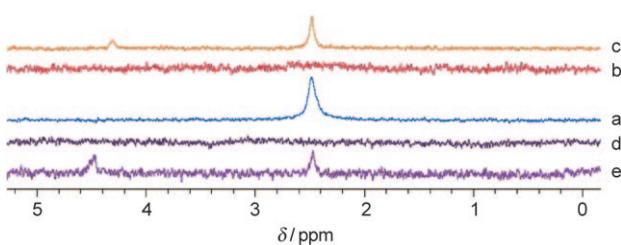


Abbildung 2. Ausschnitt aus dem NMR-Spektrum einer Lösung von Zwitterion **3** in DMSO, fokussiert auf die in den Vesikeln eingekapselten Lösungsmittelmoleküle (Gradientenstärke: $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) = 1.51 \times 10^{11} \text{ sm}^{-2}$). Das Signal für das eingeschlossene DMSO (a) verschwindet bei Zugabe von 1 Äquivalent HCl (b) und erscheint wieder, wenn man danach 1 Äquivalent NaOH zugibt (c). Das gleiche Verhalten beobachtet man auch, wenn man zu den Vesikeln zuerst 1 Äquivalent NaOH zusetzt (d) und danach die Lösung mit 1 Äquivalent HCl neutralisiert (e).

0.1M wässrigen Lösung) verschwindet das Signal für eingekapseltes DMSO (Abbildung 2b) sofort, was auf die Zerstörung der Vesikel durch die Protonierung des Carboxylats zurückzuführen ist. Das entstehende Kation ist nicht mehr selbstkomplementär und kann daher keine Vesikel bilden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Ionenpaarbildung entscheidend für die Selbstassoziation ist. Nach der Zugabe eines Äquivalents KOH (als 0.1M wässrige Lösung) entstehen erneut Vesikel, was durch das Wiedererscheinen des NMR-Signals für eingekapseltes DMSO bei $\delta = 2.5$ ppm angezeigt wird (Abbildung 2c). Durch die Basenzugabe wird wieder das Zwitterion **3** gebildet, folglich kann erneut die Selbstassoziation zu Vesikeln erfolgen. Außerdem beobachtet man ein zusätzliches Signal für eingeschlossenes Wasser (durch die Zugabe der wässrigen Säure und Base) bei $\delta = 4.5$ ppm.

Die gleiche Beobachtung lässt sich machen, wenn die Vesikelbildung in umgekehrter Richtung geschaltet wird: Nach der Zugabe eines Äquivalents KOH (0.1M in H_2O) zur Originallösung verschwindet das Signal für eingekapseltes DMSO infolge der Zerstörung der Vesikel (Abbildung 2d). Die Rückbildung der Vesikel erfolgt nach der Zugabe eines Äquivalents HCl (0.1M in H_2O) und wird durch das Wiedererscheinen des NMR-Signals für eingekapseltes DMSO und Wasser angezeigt (Abbildung 2e). Die entsprechenden Abklingkurven für das Echosignal in Abbildung 1 belegen zudem, dass das Diffusionsverhalten von eingekapseltem DMSO in den erneut gebildeten Vesikeln exakt dem in den Originalvesikeln entspricht. Daraus lässt sich folgern, dass die Vesikelbildung vollständig reversibel ist.

Diese pH-gesteuerte Vesikelbildung konnte zusätzlich durch AFM-Experimente auf einer Glimmeroberfläche bestätigt werden. Die verwendete Stammlösung (5 mM) enthielt die von L-Serin abgeleiteten Zwitterionen **3**, die in DMSO zu Vesikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 50 nm und einer Höhe von ca. 1.75 nm aggregieren (Abbildung 3a). Die ermittelte Vesikelgröße stimmt sehr gut mit den Werten überein, die aus den DLS- und Diffusionsexperimenten erhalten wurden. Nach der Zugabe eines Äquivalents HCl (1M in H_2O) verschwinden die Partikel auf der Oberfläche (Abbildung 3b). Die Rückbildung der Vesikel kann nach Zugabe eines Äquivalents NaOH (1M in H_2O) beobachtet werden (Abbildung 3c).

Wir konnten zusammenfassend zeigen, dass das kleine Zwitterion **3** in DMSO Vesikel bildet, die durch die Zugabe von Säure oder Base vollständig reversibel geöffnet und wieder geschlossen werden können. Die Vesikelbildung beruht auf dem Protonierungsgrad des Zwitterions **3**. Daher kann die Selbstassoziation durch die Protonierung (Zugabe von Säure) oder die Deprotonierung (Zugabe von Base) der Zwitterionen unterbunden werden. Die erneut gebildeten Vesikel sind dabei bezüglich der Größe und des Diffusionsverhaltens identisch zu den ursprünglichen Vesikeln. Durch ein PFG-NMR-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der Vesikel aus dem Zwitterion **3** im Vergleich zu Vesikeln aus amphiphilen Copolymeren überraschend gering ist. Diese neue Klasse von vesikelbildenden Molekülen mit ihren einzigartigen Eigenschaften könnte daher die Entwicklung von extern schaltbaren Nanomaterialien als Transportsysteme ermöglichen.

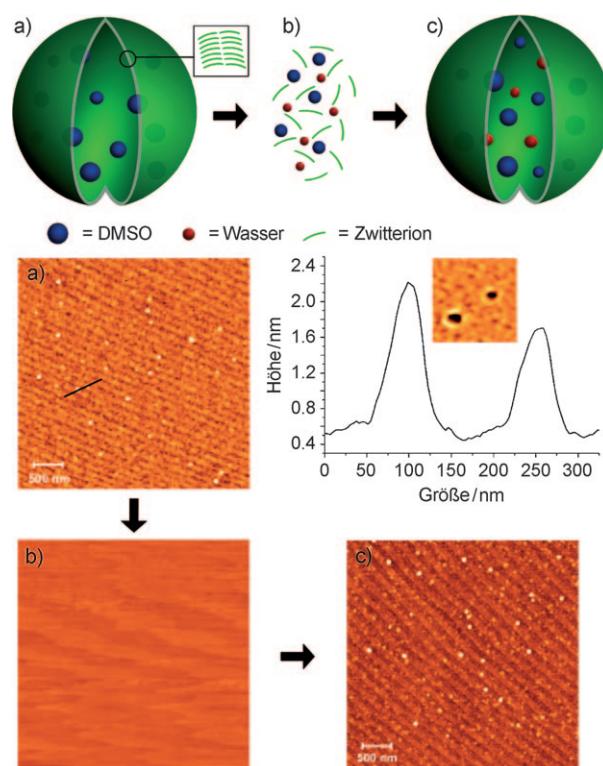


Abbildung 3. AFM-Höhenbild von **3** auf Glimmer (a). Aus dem Querschnitt (schwarze Linie) erhält man einen durchschnittlichen Durchmesser von ca. 50 nm und eine Höhe von ca. 1.75 nm. Die Vesikel verschwinden nach Zugabe eines Äquivalents HCl (b) und bilden sich erneut nach Zugabe eines Äquivalents NaOH (c).

Eingegangen am 4. Juni 2010
Online veröffentlicht am 30. September 2010

Stichwörter: Ionenpaare · Selbstorganisation · Supramolekulare Chemie · Vesikel · Zwitterionen

- [1] Übersichten zu Vesikeln: a) D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* **2002**, 297, 967; b) M. Antonietti, S. Förster, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 1323; c) Y. Morishima, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1392; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1370.
- [2] Ausgewählte Beispiele: a) H. Shen, A. Eisenberg, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3310; b) F. Chécot, S. Lecommandoux, Y. Gnanou, H.-A. Klok, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1395; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1339; c) A. Kros, W. Jesse, G. Metselaar, J. J. L. M. Cornelissen, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4423; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4349; d) E. P. Holowka, D. J. Pochan T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12423; e) D. M. Vriezema, J. Hoogboom, K. Velonia, K. Takazawa, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 796; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 772; f) M. Yang, W. Wang, F. Yuan, X. Zhang, J. Li, F. Liang, B. He, B. Minch, G. Wegner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15107.
- [3] Neuere Beispiele für eine Vesikelbildung, die nicht auf Polymeren beruht: a) D. Xie, M. Jiang, G. Zhang, D. Chen, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 3346; b) D. Dong, D. Baigl, Y. Cui, P. Sinay, M. Sollogoub, Y. Zhang, *Tetrahedron* **2007**, 63, 2973; c) H. S. Seo, J. Y. Chang, G. N. Tew, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7688; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 7526; d) K. Balakrishnan, A.

- Datar, W. Zhang, X. Yang, T. Naddo, J. Huang, J. Zuo, M. Yen, J. S. Moore, L. Zang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6576; e) F. J. M. Hoeben, I. O. Shklyarevskiy, M. J. Pouderoijen, H. Engelkamp, A. P. H. H. Schenning, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1232; f) M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625; g) X. Yan, Q. He, K. Wang, L. Duan, Y. Cui, J. Li, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2483; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2431; h) F. Garcia, L. Sanchez, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3138; i) B. J. Ravoo, R. Darcy, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4324.
- [4] T. Rehm, V. Stepanenko, X. Zhang, F. Würthner, F. Gröhn, K. Klein, C. Schmuck, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1469.
- [5] C. Schmuck, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3053.
- [6] C. Schmuck, W. Wienand, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 452.
- [7] a) C. Schmuck, T. Rehm, F. Gröhn, K. Klein, F. Reinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1430; b) C. Schmuck, T. Rehm, K. Klein, F. Gröhn, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1723; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1693.
- [8] G. Gröger, V. Stepanenko, F. Würthner, C. Schmuck, *Chem. Commun.* **2009**, 698.
- [9] J. Voskuhl, T. Fenske, M. C. A. Stuart, B. Wibbeling, C. Schmuck, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8300.
- [10] Beispiele für andere pH-schaltbare Vesikel: a) J. Du, Y. Tang, A. L. Lewis, S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17982; b) J. Du, R. K. O'Reilly, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1530; c) Z. Shi, Y. Zhou, D. Yan, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 412; d) F. Versluis, I. Tomatsu, S. Kehr, C. Fregonese, A. W. J. W. Tepper, M. C. A. Stuart, B. J. Ravoo, R. I. Koning, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13186; e) S. Yu, T. Azzam, I. Rouiller, A. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10557; f) S. Ghosh, M. Reches, E. Gazit, S. Verma, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2048; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2002.
- [11] Diese Methode beruht auf der Kombination einer Spinecho-Sequenz mit einem Satz von Feldgradientenpulsen. Die Gradientenstärke G und der Abstand Δ zwischen den Gradientenpulsen werden systematisch variiert, um so einen Satz an Echo-Abklingkurven zu erhalten. Diese werden dann durch eine numerische Auswertung basierend auf einem molekularen Austauschprozess zwischen zwei Domänen mit unterschiedlichem Diffusionsverhalten analysiert: a) A. Rumplecker, S. Förster, M. Zähres, C. Mayer, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 8740; b) A. Bauer, S. Hauschild, M. Stolzenburg, S. Förster, C. Mayer, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *419*, 430.
- [12] C. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 324.
- [13] Der Volumenanteil an eingeschlossenem DMSO kann abgeschätzt werden aus einer Extrapolation des flachen Teils der Abklingkurven in Abbildung 1. Im vorliegenden Fall liegt der Schnittpunkt mit der Ordinate bei $\ln(I/I_0) \approx -7$, was bedeutet, dass die Echo-Abklingkurve für diese Spezies bei $I/I_0 \approx e^{(-7)} \approx 0.001$ beginnt. Dagegen beginnt die Abklingkurve für frei diffundierendes DMSO bei $I/I_0 \approx \exp(0) \approx 1$. Somit beträgt der relative Volumenanteil der eingeschlossenen DMSO-Moleküle näherungsweise 0.001 (oder 0.1%).
- [14] A. Leson, V. Filiz, S. Förster, C. Mayer, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *444*, 268.