

DNA konjugiert ist, sind besonders stabil gegen 3'-Exonucleasen, die im Serum den Hauptanteil der Oligonucleotid-abbauenden Enzyme bilden. Da die DNA-PNA-Chimären von Zellen in ähnlichem Ausmaß wie Oligonucleotide aufgenommen werden, zudem weitgehend nucleaseresistent sind und eine gute Bindungsaffinität an komplementäre RNA haben, entsprechen sie den an Antisense-Wirkstrukturen gestellten Anforderungen.

Eingegangen am 15. Juli 1996 [Z 9333]

**Stichworte:** Antisense-Oligonucleotide • Helices • Nucleinsäuren

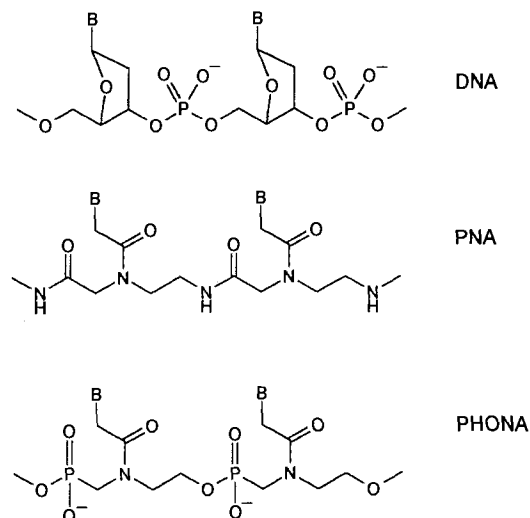
- [1] J. Engels, B. Sprunkel, E. Uhlmann in *Biotechnology*, Vol. 2 (Hrsg.: A. Pühler) VCH, Weinheim, 1993, S. 317.
- [2] U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* 1991, 103, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 613–630.
- [3] E. Uhlmann in *Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology, EC86*, (Hrsg.: L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi), Elsevier, Amsterdam, 1994, S. 667.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* 1990, 90, 543–584.
- [5] E. Uhlmann, A. Peyman in *Molecular Biology and Biotechnology*, (Hrsg.: R. A. Meyers) VCH, Weinheim, 1995, S. 38.
- [6] N. T. Thuong, C. Helene, *Angew. Chem.* 1993, 105, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 666–690.
- [7] H. Schreier, *Pharm. Acta Helv.* 1994, 68, 145–159.
- [8] S. T. Crooke, B. Lebleu, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [9] E. Uhlmann, A. Peyman in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20 (Hrsg.: S. Agrawal), Humana Press, New Jersey, Totowa, 1993, S. 355.
- [10] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* 1991, 254, 1497–1500.
- [11] C. Meier, J. Engels, *Angew. Chem.* 1992, 104, 1039–1041; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 1008–1010.
- [12] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 3–7; W. M. Pardridge, R. J. Boado, Y.-S. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 5592–5596; J. C. Norton, M. A. Piatyszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey, *Nature Biotechnol.* 1996, 14, 615–619; B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* 1996, 4, 5–23.
- [13] P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, B. Norden, *Nature* 1994, 368, 561–563.
- [14] F. Bergmann, W. Bannwarth, S. Tam, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 6823–6826.
- [15] K. H. Petersen, D. K. Jensen, M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995, 5, 1119–1124.
- [16] A. C. van der Laan, N. J. Meeuwenoord, E. Khyt-Yeheskiely, R. S. Oosting, R. Brands, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1995, 114, 295–297; D. A. Stetsenko, E. N. Lubyako, V. K. Potapov, T. L. Azhikina, E. D. Sverdllov, *Tetrahedron* 1996, 37, 3571–3574.
- [17] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. K. nolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* 1995, 51, 12069–12082.
- [18] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 3185–3191.
- [19] Es wurde die gesamte zelluläre Aufnahme des Oligomers wie früher beschrieben bestimmt: A. Peyman, A. Rye, M. Helsenberg, G. Kretzschmar, M. Mag, E. Uhlmann, *Nucleosides Nucleotides* 1995, 14, 1077–1081.

## Phosphonsäureester-Nucleinsäuren (PHONAs): Oligonucleotid-Analoga mit achiralem Rückgrat

Anusch Peyman\*, Eugen Uhlmann, Konrad Wagner, Sascha Augustin, Gerhard Breipohl, David W. Will, Andrea Schäfer und Holger Wallmeier

Oligonucleotide haben als Therapeutika und in der Diagnostik stark an Bedeutung gewonnen<sup>[1, 2]</sup>. Insbesondere an Antisense-Oligonucleotide werden neben der effizienten, sequenzspezifischen molekularen Erkennung von DNA und RNA

weitere Anforderungen gestellt, wie Nucleasestabilität und Zellgängigkeit<sup>[1, 2]</sup>. Daher kamen zahlreiche Oligonucleotid-Analoga mit verbesserten Eigenschaften zum Einsatz<sup>[1]</sup>; Derivatisierungen der Oligonucleotide reichten von der einfachen Modifikation der Phosphodiester-Brücke, z. B. in Phosphorothioaten, bis hin zum Austausch der Phosphat-Gruppe<sup>[1, 3]</sup> oder des gesamten Zucker-Phosphat-Rückgrats, z. B. in den Morpholino-Nucleosid-Oligomeren<sup>[4]</sup> oder den Polyamid-Nucleinsäuren (PNAs)<sup>[5]</sup>. Die PNAs (Schema 1) stehen wegen ihrer hervor-



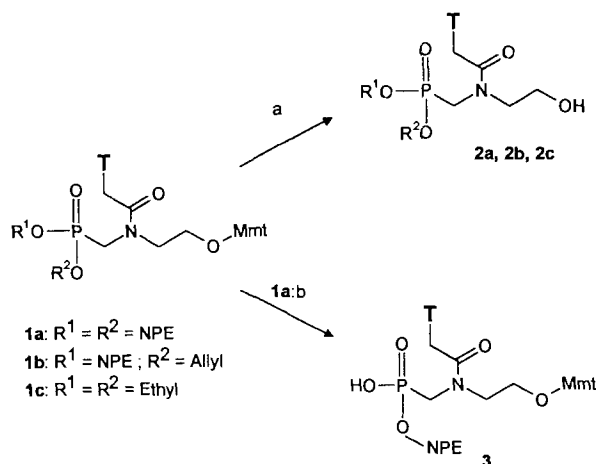
Schema 1. Strukturelemente von DNA, PNA und PHONA.

ragenden Bindungseigenschaften an komplementäre DNA und RNA im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Sie sind aus (N-2-Aminoethylglycin)-Einheiten aufgebaut, an die die Nucleobasen über einen Methylencarbonyl-Linker gekoppelt sind. Die Synthese der PNAs erfolgt durch Kondensation der Monomere nach peptidchemischen Methoden<sup>[5–7]</sup>. PNAs sind zur PNA-DNA-Duplexbildung und zur Bildung außergewöhnlich stabiler (PNA)<sub>2</sub>-DNA-Tripelhelices fähig. Die größten Probleme bei der Anwendung der PNAs als Therapeutika sind ihre schlechte Wasserlöslichkeit, die mit einer hohen Tendenz zur Selbstaggregation verbunden ist, sowie eine unzulängliche Zellaufnahme<sup>[5, 8]</sup>.

Wir beschreiben hier den Aufbau eines achiralen Rückgrats, an das die Nucleobasen ähnlich wie bei den PNAs über Methylencarbonyl-Linker geknüpft sind und das negative Ladungen trägt, um eine ausreichende Wasserlöslichkeit zu garantieren. Um die Bindung an komplementäre DNA zu gewährleisten, wurde auch der Abstand zwischen den Basen von der PNA-Struktur übernommen. Ein Gerüst, das diese Forderungen erfüllt, ist das N-(2-Hydroxyethyl)aminomethylphosphonsäureester-Rückgrat (Schema 1; phosphonoester nucleic acid = PHONA). Im folgenden beschreiben wir die Synthese eines Nonamers dieser Verbindungsklasse sowie dessen Bindungseigenschaften an komplementäre DNA. Als Nucleobase wählten wir Thymin, da dieses keiner zusätzlichen Schutzgruppe bedarf.

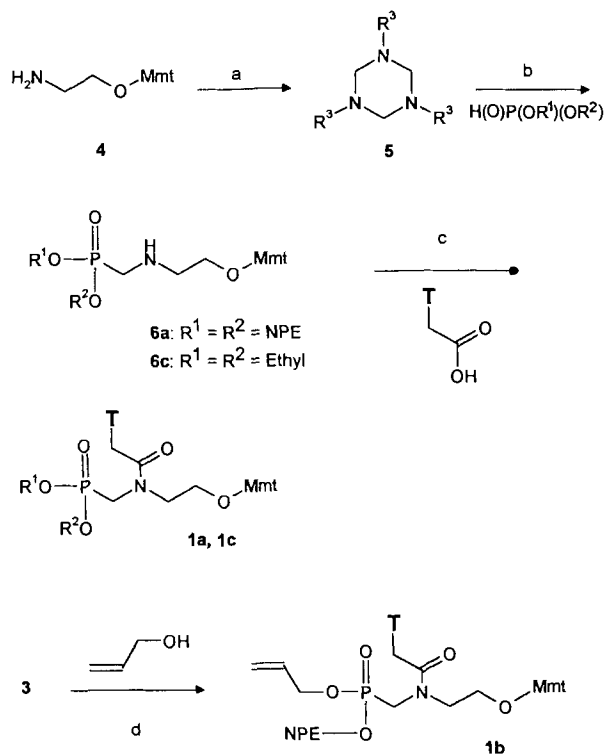
Die Synthese des Nonamers erfolgte in Lösung durch Blockkondensation, die bei der DNA-Synthese nach der Phosphotriester-Methode erfolgreich eingesetzt wurde<sup>[9]</sup>. Entscheidend für eine erfolgreiche Synthese oligomerer Verbindungen ist die Wahl geeigneter Schutzgruppen. Für die Monomere 1a–c wählten wir die orthogonale Kombination aus 4-Methoxyphenyldiphenylmethyl(Mmt)- für den Alkohol und 2-(4-Nitrophenyl)ethyl(NPE)-Gruppe<sup>[10]</sup> für die Phosphonsäure (Schema 2).

[\*] Dr. A. Peyman, Dr. E. Uhlmann, K. Wagner, S. Augustin, Dr. G. Breipohl, Dr. D. W. Will, Dr. A. Schäfer, Dr. H. Wallmeier  
Hoechst AG, Central Pharma Research G838  
D-65926 Frankfurt  
Telefax: Int. +69/33 1399



Schema 2. Synthese der Monomere **2** und **3** aus **1**; T: Thymin; Mmt: 4-Methoxyphenyldiphenylmethyl; NPE: 2-(4-Nitrophenyl)ethyl; a) 80% AcOH, RT, 4 h, 80%; b) 0.1 M DBU, Py, 4 h, 90%.

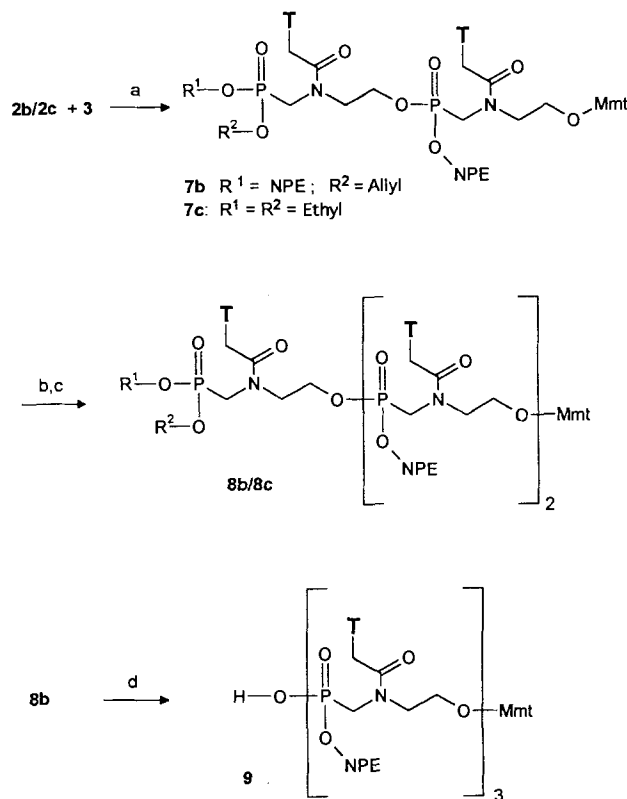
Mit Essigsäure läßt sich die Mmt-Gruppe an **1** entfernen, wobei die Bausteine **2a–c** mit jeweils freier Hydroxygruppe erhalten werden. Alternativ kann einer der beiden NPE-Phosphonsäureester von **1a** durch  $\beta$ -Eliminierung mit 0.1 M DBU selektiv zum Baustein **3** gespalten werden. Die Synthese der Monomere **1** erfolgt nach Schema 3, wobei das Grundgerüst **6** durch Addition eines Phosphits an **5** hergestellt wird. Die Kopplung der Nucleobasen an **1** erfolgt analog zur PNA-Synthese<sup>[6]</sup>. Lediglich Baustein **1b**, der in der Phosphonsäureallylestereinheit eine weitere für die selektive Aktivierung der Trimere notwendige orthogonale Schutzgruppe<sup>[11]</sup> trägt, wird aus **3** durch Kondensation mit Allylkohol und 3-Nitro-1-(*p*-toluolsulfonyl)-



Schema 3. Synthese der Monomere **1**;  $R^3$ :  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMmt}$ . a)  $\text{CH}_2\text{O}$ , MeOH, RT, 4 h, 55%; b) 100 °C, 30 min, 60%; c) Thymin-1-yl-essigsäure [6], Hydroxybenzotriazol, *N*-Ethylmorpholin, Diisopropylcarbodiimid, DMF; RT, 16 h, 90%; d) 3-Nitro-1-(*p*-toluolsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol (TSNT), Py, 95%.

1*H*-1,2,4-triazol (TSNT) in Pyridin analog dem in der Triesterchemie<sup>[1,9]</sup> beschriebenen Verfahren erhalten.

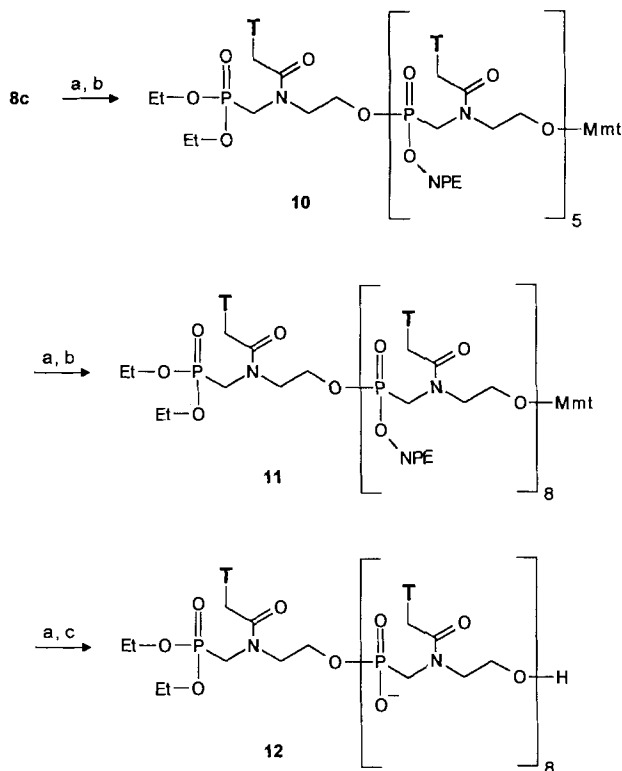
Die Trimere **8** werden durch schrittweise Kondensation von **2** mit **3** mit TSNT in Pyridin erhalten (Schema 4), wobei Ausbeuten (isoliertes Produkt) von 70–90% erzielt werden. Aus **8b** läßt sich die Allylgruppe unter neutralen Bedingungen mit  $\text{Pd}^0$  ohne Beeinträchtigung der Mmt- oder NPE-Gruppe<sup>[11]</sup> zum trimeren Phosphonsäuremonoester **9** abspalten.



Schema 4. Synthese der Trimere **9**; a) TSNT, Py, 95%; b) 80% AcOH, RT, 4 h, 80%; c) **3**, TSNT, Py, 70%; d) Tetrakis(triphenylphosphan)palladium(0), Triphenylphosphan, Diethylammoniumhydrogencarbonat,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 15 °C, 30 min, 57%.

Die Synthese der nonameren PHONA **12** erfolgt durch die sukzessive Kondensation des Trimers **8c** mit zwei Trimeren **9** (Schema 5). Dann werden die Mmt-Schutzgruppe mit 80% Essigsäure und die NPE-Schutzgruppen mit 0.5 M DBU in Pyridin entfernt. Verbindung **12** ist (wie erwartet) hervorragend wasserlöslich und tendiert nicht zur Selbstaggregation. Reinheit und Identität von **12** wurden durch HPLC bzw. durch Massenspektrometrie [ $\text{ES}^-$ :  $m/z = 2803$  (ber.), 2802 ( $M-H$ ) (gef.)] überprüft.

Die Fähigkeit der PHONAs, mit komplementärer DNA stabile Hybride zu bilden, wurde anhand von UV-Schmelzkurven, durch Gelshift-Experimente sowie massenspektrometrisch untersucht. In Abbildung 1 ist die Schmelzkurve von **12** mit  $d(A_9)$  (Verhältnis 1:1) dargestellt. Es findet ein sauberer Phasenübergang statt; die so ermittelte Schmelztemperatur  $T_m$  beträgt 21 °C und liegt im Bereich der Schmelztemperatur des DNA-DNA-Hybrids aus  $d(T_9)$  und  $d(A_9)$  (22 °C). Mit **12** allein wird dieser Schmelzprozeß nicht beobachtet. Das 2:1-Gemisch aus **12** und  $d(A_9)$  führt zum gleichen Kurvenverlauf, was die Vermutung nahelegt, daß die Stöchiometrie des Hybrids bei 1:1 liegt. Beim Abkühlen erfolgt kein Phasenübergang, was an einer bei den PNAs oft beobachteten Hysterese liegen könnte.



Schema 5. Blocksynthese von **12** aus drei Trimeren. a) 80% AcOH, RT, 4 h, 80%; b) **9**, TSNT, Py, 70%; c) 0.5 M DBU, Py, 24 h, RT, 80%.

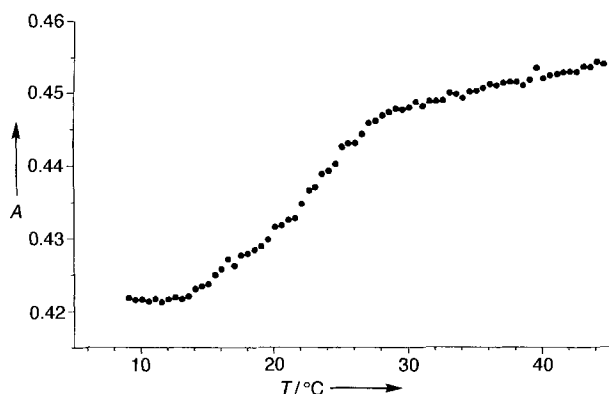


Abb. 1. UV-Schmelzkurve ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) des Hybrids von **12** mit  $d(A_9)$ ; 0.15 OD **12** und 0.15 OD  $d(A_9)$  in 0.7 mL Puffer (1 M NaCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES (= 2-(4-(Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethansulfonsäure), pH 7.5); Heizgeschwindigkeit:  $1 \text{ K min}^{-1}$ ;  $T_m = 21^\circ\text{C}$ .

Die Hybridisierung von **12** mit  $d(A_9)$  wurde darüber hinaus durch ein Gelshift-Experiment demonstriert. Dazu wurden  $d(A_9)$  und **12** jeweils allein und gemischt im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel (20%, Puffer: 0.05 M Tris(hydroxymethyl)aminomethanborat; pH = 8.0; 0.002 M EDTA; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) aufgetragen und das Laufverhalten der Komponenten bei  $10^\circ\text{C}$  (unterhalb der Schmelztemperatur des Hybrids) untersucht (Abb. 2):  $d(A_9)$  läuft schneller als **12**; in der 1:1-Mischung sind beide nur noch schwach zu sehen, dafür ist eine Bande entstanden, die vom Komplex zwischen den beiden Komponenten stammt. In der 1:2-Mischung ist  $d(A_9)$  nicht mehr erkennbar, dafür ist die neue Bande um so deutlicher. Das gleiche gilt für die 1:5- und die 1:10-Mischung, in denen darüber hinaus das deutlich im Überschuß vorliegende **12** sichtbar ist. Das Gelshift-Experiment lie-

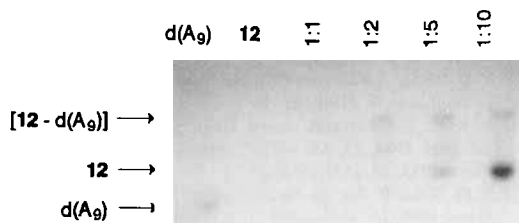


Abb. 2. Gelshift-Experiment zum Nachweis der Bildung eines Hybrids von  $d(A_9)$  mit **12**. Dazu wurde das Laufverhalten von  $d(A_9)$  und **12** bestimmt, jeweils allein und gemischt im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 in einem Polyacrylamidgel; 20%, Puffer: 0.05 M Tris(hydroxymethyl)aminomethanborat; pH = 8.0; 0.002 M EDTA; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $10^\circ\text{C}$ ; aufgetragen wurden jeweils 0.1 OD  $d(A_9)$  und 0.1, 0.2, 0.5 bzw. 1.0 OD **12**.

fert einen weiteren deutlichen Hinweis auf die Bildung eines 1:1-PHONA-DNA-Hybrids; bei ähnlichen Experimenten<sup>[12]</sup> wurden für die Duplexbildung (wie hier) eine neue Bande und für die Tripelhelixbildung zwei neue Banden beobachtet, die auf Duplex bzw. Tripelhelix zurückgeführt werden können. Bei Homopyrimidin-PNAs ist der zunächst gebildete PNA-DNA-Duplex kaum nachweisbar, da er sofort mit einem zweiten PNA-Strang eine  $(\text{PNA})_2$ -DNA-Tripelhelix bildet. Dieser Vorgang ist auch für die PHONAs nicht ganz auszuschließen.

Das Hybrid aus **12** und  $d(A_9)$  ließ sich ebenso wie das Hybrid aus  $d(T_9)$  und  $d(A_9)$  massenspektrometrisch<sup>[13]</sup> ( $\text{ES}^-$ ) nachweisen. Für den nonameren PHONA-DNA-Duplex wurde eine Masse von 5559.8 (ber. 5559.9) festgestellt, für den analogen DNA-DNA-Duplex  $d(T_9)$ - $d(A_9)$  eine Masse von 5431.4 (ber.: 5432.7). Hinweise auf die Bildung einer Tripelhelix wurden in diesem Experiment nicht erhalten.

Wir haben die Synthese einer neuen Klasse von DNA-Analoga auf der Basis eines achiralen (2-Hydroxyethyl)aminomethylphosphonsäureester-Gerüsts beschrieben. Diese Substanzen haben vielversprechende Bindungseigenschaften hinsichtlich komplementärer DNA und sind gut wasserlöslich. Andere wichtige Eigenschaften wie Nucleasestabilität bedürfen weiterer Untersuchungen. In unseren aktuellen Arbeiten werden die gewonnenen Ergebnisse auf Oligomere mit gemischten Nucleobasen übertragen.

Eingegangen am 15. Juli 1996 [Z 9334]

**Stichworte:** Antisense-Oligonucleotide • Helixverbindungen • Nucleinsäuren

- [1] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584; *Antisense Research and Applications* (Hrsg.: S. T. Crooke, B. Lebleu), CRC Press, Boca Raton, FL, **1993**; „Antisense Oligonucleotides – Chemical Modifications“: E. Uhlmann, A. Peyman in *Encyclopedia of Molecular Biology and Biotechnology* (Hrsg.: E. Meyer), VCH, New York, **1995**; A. De Mesmacker, R. Häner, P. Martin, H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 366–374.
- [2] U. Englisch, D. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613–630; S. Beck, H. Köster, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2258; F. C. Tenover, *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1*, 82–101.
- [3] E. Uhlmann, A. Peyman in *Methods in Molecular Biology* (Vol. 20: *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*) (Hrsg.: S. Agrawal), Humana Press, New Jersey, Totowa, Kap. 16, **1993**, S. 355–389; P. E. Nielsen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 167–183; A. De Mesmacker, K.-H. Altmann, A. Waldner, S. Wendeborn, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 343–355.
- [4] E. P. Storchak, J. E. Summerton, D. D. Weller, *Nucleic Acid Res. Future Dev. Proc. Symp.* **1989**, *17*, 6129–6141.
- [5] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5–23.
- [6] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpus, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5767–5773.
- [7] D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1995**, *44*, 12069–12082; G. Breipohl, J. Knolle, D. Langner, G. O'Malley, E. Uhlmann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 665–670.

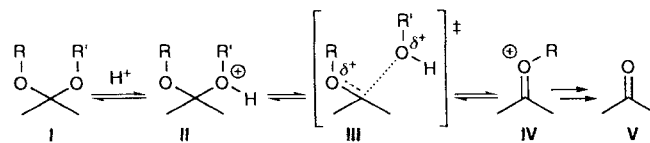
- [8] J. C. Hanvey, N. J. Peffer, J. E. Bisi, S. A. Thomson, R. Cadilla, J. A. Josey, D. J. Ricca, F. Hassman, M. A. Bonham, K. G. Au, S. G. Carter, D. A. Brukenstein, A. L. Boyd, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Science* **1992**, 258, 1481–1485.
- [9] C. B. Reese, *Tetrahedron* **1978**, 34, 3143–3179.
- [10] E. Uhlmann, W. Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 1688–1703.
- [11] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 426–427; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 436–437; Y. Hayakawa, M. Hirose, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5551–5555.
- [12] R. G. Shea, P. Ng, N. Bischofberger, *Nucleic Acid Res. Future Dev. Proc. Symp.* **1990**, 18, 4859–4866; T. L. Trapane, R. I. Hogrefe, M. A. Reynolds, L.-S. Kan, P. O. P. Ts'O, *Biochemistry* **1996**, 35, 5495–5508.
- [13] B. Ganem, Y.-T. Li, J. D. Henion, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1445–1448.

## Katalytische Antikörper als Sonden für die Evolution von Enzymen: Modellierung einer frühen Glycosidase\*\*

Doron Shabat, Subhash C. Sinha\*, Jean-Louis Reymond\* und Ehud Keinan\*

Enzyme weisen eine bemerkenswerte katalytische Wirksamkeit auf, weil ihre Funktion auf mehreren gut abgestimmten Prinzipien beruht. Dies ist ein Ergebnis der Evolution und der natürlichen Auslese. Man kann sich fragen, wie die katalytische Wirksamkeit bei den frühen Enzymen entstanden ist. Um diese Frage beantworten zu können, muß man wissen, welche dieser Prinzipien bei einem heutigen Enzym unabhängig von den übrigen die Katalyse auslösen können. Katalytische, maßgeschneiderte Antikörper<sup>[1]</sup> bieten eine einzigartige Möglichkeit, *experimentell* Hypothesen über frühe Enzyme zu prüfen. Bei katalytischen Antikörpern lassen sich die einzelnen Parameter der Katalyse viel leichter getrennt untersuchen als bei den hochentwickelten Enzymen, bei denen sie gleichzeitig wirken. So lieferten die Untersuchungen von Schultz et al. einen Einblick in die Evolution der katalytischen Fähigkeiten von Proteinen<sup>[2]</sup>. Wegen der Bedeutung von Kohlenhydraten in den frühen Stadien der Evolution ist die Entstehung der Glycosidase-Aktivität von besonderem Interesse. Wir berichten hier über die von Antikörpern katalysierte Hydrolyse nichtaktivierter cyclischer Ketale. Diese Reaktion ist eng mit der Spaltung der glycosidischen Bindung verwandt<sup>[3]</sup>. Die katalytischen Antikörper können deshalb als mechanistische Analoga der Glycosidasen betrachtet werden. Bei diesen Antikörpern spielen die allgemeine Säurekatalyse und/oder Spannungseffekte nur eine untergeordnete Rolle, während sie für die Aktivität der heutigen Glycosidasen von zentraler Bedeutung sind<sup>[4]</sup>. Die einfache Ladungskomplementarität erweist sich als der wichtigste Faktor für die katalytische Aktivität der Antikörper.

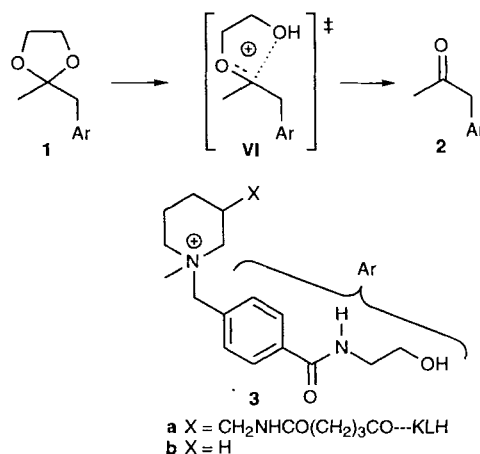
Bei der Hydrolyse von Ketalen **I** wird zunächst ein Sauerstoffatom protoniert und anschließend eine C-O-Bindung heterolytisch gespalten, was zu dem Ion **IV** als Intermediat und letztlich zur Carbonylverbindung **V** führt (Schema 1). Im Falle von



Schema 1. Mechanismus der Hydrolyse eines Ketals unter sauren Bedingungen.

Ketalen und Acetalen mit einer aktivierten Abgangsgruppe (z. B.  $R' = \text{Aryl}$ ) ist der erste Schritt der geschwindigkeitsbestimmende; ihre Hydrolyse läßt sich mit schwachen Säuren katalysieren (allgemeine Säurekatalyse)<sup>[5, 6]</sup>. Im Unterschied dazu handelt es sich im Falle nichtaktivierter Ketale (z. B.  $R' = \text{Alkyl}$ )<sup>[7]</sup> bei der O-protonierten Verbindung **II** um ein verhältnismäßig stabiles Intermediat, das in einer Vorgleichgewichtsreaktion entsteht. Damit ist die Spaltung der C-O-Bindung (über den Übergangszustand **III**) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Hydrolyse nichtaktivierter Ketale oder Acetale kann deshalb nicht durch schwache Säuren katalysiert werden, sondern hängt nur vom pH-Wert ab (spezifische Säurekatalyse). Dieses Reaktivitätsmuster gilt auch für die Hydrolyse der glycosidischen Bindung und ist beim Entwurf eines Biokatalysators eine besondere Herausforderung, weil eine schwache Säure allein nicht ausreicht, um die Reaktion einzuleiten.

Das Dioxolan **1**<sup>[8]</sup> wird in wäßrig-saurem Medium zum Keton **2** und Ethylenglycol hydrolysiert. Obwohl die Hydrolysegeschwindigkeit vom pH-Wert abhängt, ist sie vollkommen unempfindlich gegenüber der Art des Puffers und dessen Konzentration. Wie aus dem inversen Lösungsmittel-Isotopeneffekt ( $k_H/k_D = 0.4$ ) ersichtlich, liegt bei dieser Reaktion spezifische Säurekatalyse vor; dabei ist die Spaltung der C-O-Bindung im protonierten Intermediat **II** zum Ion **IV** geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Bei diesem Schritt weitet sich der protonierte Dioxolanring auf und die positive Ladung bewegt sich vom austretenden Sauerstoffatom zum verbleibenden. Damit ist das Piperidinium-Kation **3** ein Analogon zum Übergangszustand **VI** (Schema 2): Das positiv geladene Stickstoffzentrum in **3** ent-



Schema 2. Übergangszustand **VI** und Analogon **3** zum Übergangszustand für die Hydrolyse des Ketals **1** zum Keton **2**.

spricht dem entstehenden Zentrum im Ion **IV**, der sechsgliedrige Piperidiniumring dem aufgeweiteten Fünfring von **VI**.

Wir prüften 46 gegen **3a** gerichtete monoklonale Antikörper<sup>[6a]</sup> auf katalytische Wirksamkeit in der Hydrolyse von **1**. Zwei von ihnen, die Antikörper 14D9 und 20B11<sup>[9]</sup>, katalysieren die Reaktion. In beiden Fällen gehorchte die Katalyse der Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 1) und ließ sich durch das

[\*] Prof. J.-L. Reymond, Prof. E. Keinan, S. C. Sinha  
Department of Molecular Biology and Skaggs Institute of Chemical Biology  
The Scripps Research Institute  
10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Telefax: Int. + 619/784-7313  
E-mail: Keinan@Scripps.edu

Prof. E. Keinan, D. Shabat  
Department of Chemistry, Technion – Israel Institute of Technology  
Technion City, Haifa 32000 (Israel)

[\*\*] J.-L. R. dankt den US National Institutes of Health (GM 49736). E. K. dankt der US-Israel Binational Science Foundation und PharMore Biotechnologies für finanzielle Unterstützung.