

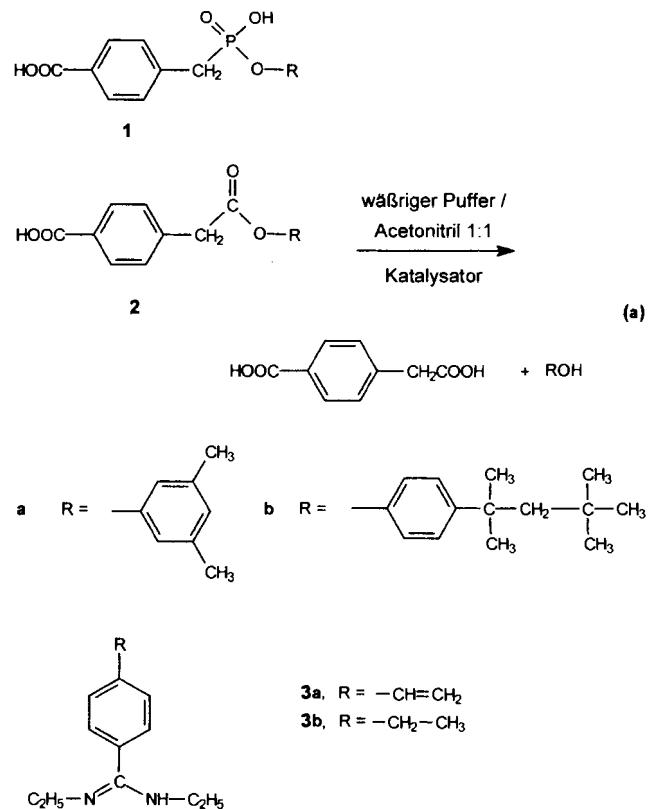
Molekular geprägte Polymere als Enzymmodelle mit starker Esteraseaktivität**

Günter Wulff,* Thomas Groß und Rainer Schönfeld

Enzymmodelle sind von Interesse,^[1] da sie zum einen als synthetische Katalysatoren genutzt werden können und zum anderen zur Prüfung von Theorien und Hypothesen der Enzymforschung dienen. So konnte die von L. Pauling zuerst geäußerte^[2a] und später von W. P. Jencks ausführlich begründete These^[2b] von der bevorzugten Bindung des Übergangszustandes einer Reaktion an das Enzym durch Versuche mit Enzymmodellen auf der Basis von Übergangszustandsgeprägten Antikörpern^[3] nachgewiesen werden. Werden z. B. Antikörper gegen einen Phosphonsäureester, ein Übergangszustandsanalogon der basischen Esterhydrolyse, erzeugt, so katalysieren diese die Spaltung von Carbonsäureestern um den Faktor 10^3 – 10^4 . Wir haben schon vor längerer Zeit^[4, 5] ein Verfahren beschrieben, bei dem spezifische Hohlräume in Polymeren durch molekulare Prägung („Imprinting“) erhalten werden. Dabei wird – ähnlich wie man es sich früher für die Bildung der Antikörper vorstellte – um die als Matrizen (Templat) wirkenden Moleküle herum vernetzend polymerisiert und diese anschließend wieder herausgelöst. Zurück bleibt im Polymer ein Abdruck („Imprint“) vorgegebener Form mit zur Wechselwirkung befähigten Gruppen. Es liegt auf der Hand, daß auf diese Weise ebenfalls Übergangszustandsgeprägte Enzymmodelle herzustellen sein sollten. Die bisherigen Versuche, durch Prägen, z. B. mit Phosphonsäureestern, Enzymmodelle mit Esteraseaktivität zu erhalten, verließen allerdings recht enttäuschend.^[6] Beschleunigungen von 1.6- bis 2fach, in einem Fall auch von 6.7fach, lassen noch sehr zu wünschen übrig, insbesondere da in den meisten Fällen auch keine Michaelis-Menten-Kinetik, keine kompetitive Hemmung und kein Turnover beobachtet wurden.

Man kann aus den bisherigen Ergebnissen anderer^[7] und zahlreicher eigener Versuche schließen, daß mit der Übergangszustandsanalogon Form eines Hohlraums allein offenbar keine stärkeren katalytischen Effekte zu erzielen sind; man benötigt zusätzlich katalytisch wirksame Gruppierungen. Auch in katalytischen Antikörpern haben bestimmte Gruppierungen in der richtigen Position im Hohlraum eine entscheidende Funktion. S. J. Benkovic et al.^[8] stellten z. B. fest, daß der Guanidinrest der Aminosäure Arginin zur Positionierung und Fixierung von Phosphonsäuremonoestern während der Antikörperbildung entscheidend ist und daß diese Gruppierung bei der basischen Esterhydrolyse auch eine entscheidende katalytische Rolle spielt. Wir haben jetzt polymerisierbare Amidinderivate entwickelt,^[9, 10] wobei die Amidingruppen während der Polymerisation und im Polymer als Haftgruppen bzw. als katalytisch aktive Gruppen fungieren sollen. Ausführliche Untersuchungen zur Wechselwirkung von Amidinen mit Carbonsäuren und Phosphonsäuremonoestern haben gezeigt, daß z. B. *N,N'*-Diethyl-(4-vinylphenyl)amidin mit derartigen Verbindungen gut lösliche Komplexe mit hohen Assoziationskonstanten bildet. Während im Monomer sowie in dessen Hydrochlorid die Ethylgruppen (*E*)- oder (*Z*)-orientiert sein können, liegen in den Komplexen lediglich (*E*)-orientierte Ethylgruppen vor.^[11]

Als Übergangszustandsanalogon für die basische Esterhydrolyse von **2** [Gl. (a)] wurde der Phosphonsäuremonoester **1** be-



nutzt, der in vier Stufen in guten Ausbeuten aus 4-Chlormethylbenzoates herstellbar ist. In unpolaren Lösungsmitteln bildet sich aus **1a** und zwei Äquivalenten des Amidins **3a** fast quantitativ (NMR-Spektroskopie) das Bisamidiniumsalz (siehe Schema 1 oben). Dieses Salz wird in Gegenwart eines Inertlösungsmittels (THF) mit Ethylendimethacrylat als Vernetzer (großer Überschuß) copolymerisiert. Die Matrize läßt sich zu 90% wieder entfernen, wobei Hohlräume mit je zwei Amidinresten entstehen (Schema 1 Mitte). Aufgrund der großen Bindungskonstanten konnten stöchiometrische Mengen der Haftgruppenverbindung **3a** eingesetzt werden, so daß Amidinreste sich nur in den Hohlräumen befinden. Bei anderen nicht-kovalenten Wechselwirkungen ist fast immer ein großer Überschuß der Haftgruppen erforderlich.

Die Hydrolyse nach Gleichung (a) des Esters **2a** wurde in einer 1:1-Lösung aus Puffer (pH 7.0, 7.6 und 9.0) und Acetonitril in Gegenwart des mit **1a** hergestellten Polymers durchgeführt (siehe Tabelle 1). Zum Vergleich wurde die Hydrolyse allein in Lösung bei dem betreffenden pH-Wert sowie unter Zusatz des Amidins **3b** (äquivalent zu der im Polymer enthaltenen Menge Amidin) und auch in Gegenwart eines Polymers, das

Tabelle 1. Relative Geschwindigkeiten der Hydrolyse von **2a** und **2b** in Gegenwart verschiedener Katalysatoren.

Substrat	pH-Wert	$k[\text{min}^{-1}]$ [a]	Relative Geschwindigkeit			
			reine Lösung	3a -Benzooxygeprägtes Polymer	1a - oder 1b -geprägtes Polymer	
2a	7.0	$8.9 \cdot 10^{-7}$	1.0	1.5	10.9	49.0
2a	7.6	$9.2 \cdot 10^{-7}$	1.0	2.4	20.5	102.2
2a	9.0	$4.2 \cdot 10^{-6}$	1.0	1.9	4.7	17.6
2b	7.6	$3.1 \cdot 10^{-6}$	1.0	n.b.	n.b.	81.4
2b	9.0	$2.3 \cdot 10^{-6}$	1.0	2.0	14.9	52.4

[a] Die Geschwindigkeitskonstante k bezieht sich auf die Reaktion in Puffer/Acetonitril (1:1) ohne Amidin- oder Polymerzusätze. Dieser Wert wurde bei der Berechnung der relativen Geschwindigkeiten 1.0 gesetzt.

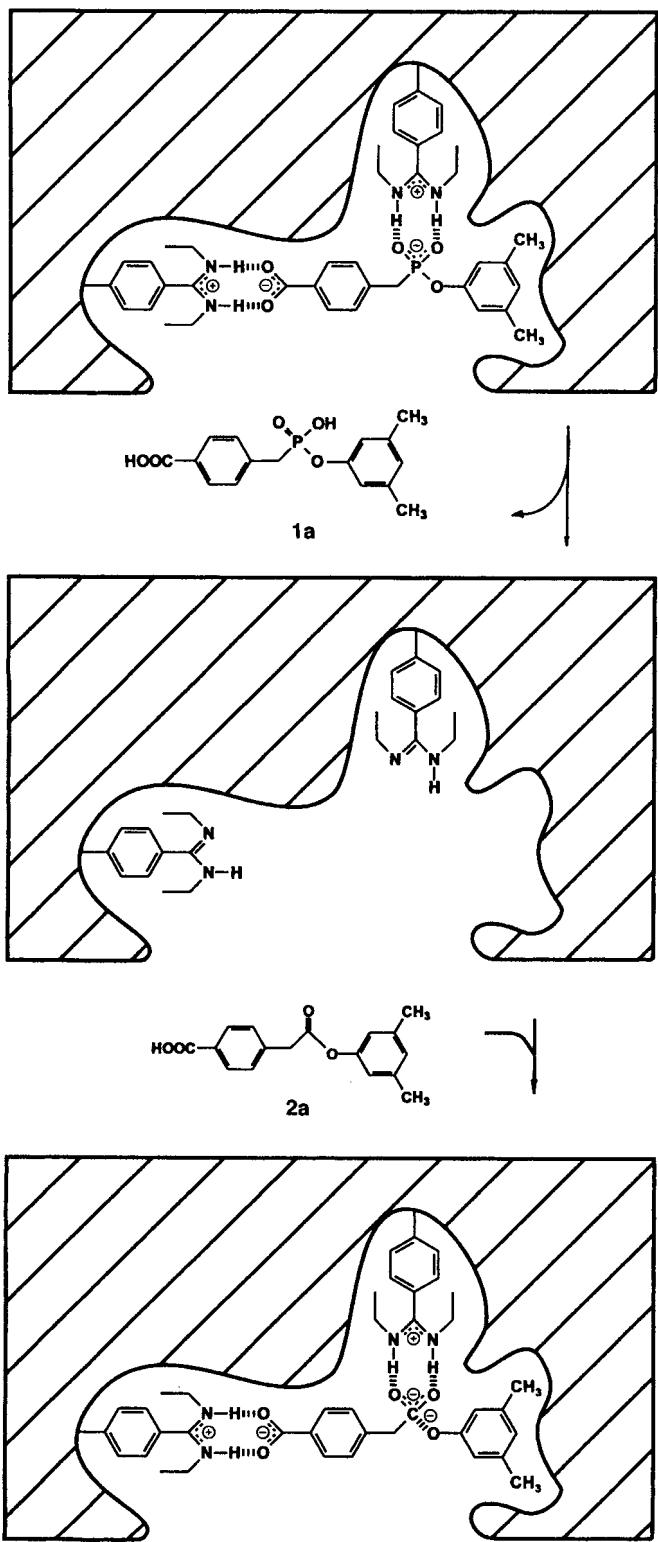
[*] Prof. Dr. G. Wulff, Dr. T. Groß, Dipl.-Chem. R. Schönfeld

Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Universität
Universitätsstraße 1, D-40225 Düsseldorf

Telefax: Int. +211/8114788

E-mail: WULFFG@IRIS-OC2.OC2.UNI-DUESSELDORF.DE

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.



Schema 1. Schematische Darstellung eines Hohlräumes, der bei der Polymerisation des Bisamidiniumsalzes von **3a** mit dem Übergangszustandsanalogen **1a** als Matrix geprägt wurde (oben). Nach Abspaltung der Matrix **1a** bleibt ein Hohlräum mit zwei *N,N'*-Diethylamidinresten (Mitte). Die basische Hydrolyse des Esters **2a** wird durch dieses Polymer katalysiert, wobei der Übergangszustand der Reaktion besonders gut stabilisiert werden kann (unten).

mit dem Benzoesäuresalz von **3a** geprägt war, durchgeführt (ein Polymer mit statistisch einpolymerisiertem **3a** verhielt sich ähnlich wie eine Lösung mit dem Amidin). Der Reaktionsverlauf bei 21 °C wurde mit HPLC an einer RP8-Säule mit UV-Detek-

tion bei 238 nm verfolgt. Alle Komponenten der Gleichung (a) und der interne Standard Propiophenon konnten sauber getrennt werden („Grundlinientrennung“). Die Kinetik wurde auf die gebildete Homoterephthalsäure bezogen, die Geschwindigkeitskonstanten wurden aus der Anfangsgeschwindigkeit berechnet.

Ähnlich wie es bei den katalytischen Antikörpern gemacht wurde, haben wir die Geschwindigkeit der Reaktion auf die der Hydrolyse in Lösung bei dem betreffenden pH-Wert bezogen und diese gleich 1.0 gesetzt. Das Amidinderivat **3b** zeigt in Lösung einen relativ geringen Effekt. Ungewöhnlich stark sind jedoch die Beschleunigungen durch das mit **1a** geprägte Polymer, wobei die Reaktion bei pH 7.6 um mehr als das Hundertfache beschleunigt wird. Auch das mit **3a**-Benzoat geprägte Polymer verursacht eine deutliche Beschleunigung (20fach). Das mit der strukturell ähnlich gebauten Matrize **1b** geprägte Polymer beschleunigt die Hydrolyse des entsprechenden Esters **2b** ebenfalls sehr stark (80fach).

Es handelt sich hier um die mit Abstand stärksten katalytischen Effekte bei der Esterhydrolyse die mit geprägten Polymeren bisher erreicht werden konnten. Selbst gegenüber den katalytischen Antikörpern fehlen nur noch ein bis zwei Größenordnungen, was in Anbetracht der Tatsache, daß es sich um rigide, unlösliche Polymere mit „polyklonalen“ Hohlräumen handelt, kein großer Unterschied mehr ist. Es sollte auch darauf hingewiesen werden, daß die Substrate in unserem Fall nicht-aktivierte Phenoylester sind und nicht, wie in fast allen anderen Untersuchungen, stark aktivierte 4-Nitrophenylester.

Haben die neuen geprägten Polymere auch die sonstigen typischen Enzymeigenschaften? Für die in Tabelle 1 angeführten Systeme wurden Kinetiken mit stark unterschiedlichem Substrat/Katalysator-Verhältnis gemessen. Das mit **1a** geprägte Polymer zeigt bei der Hydrolyse eine typische Michaelis-Menten-Kinetik mit Sättigungskinetik, während die Hydrolyse mit der reinen Lösung und der Lösung mit **3b** durch einen linearen Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Konzentration gekennzeichnet ist; überraschend tritt auch bei dem mit dem **3a**-Benzoat geprägten Polymer eine gewisse Substratsättigung auf.

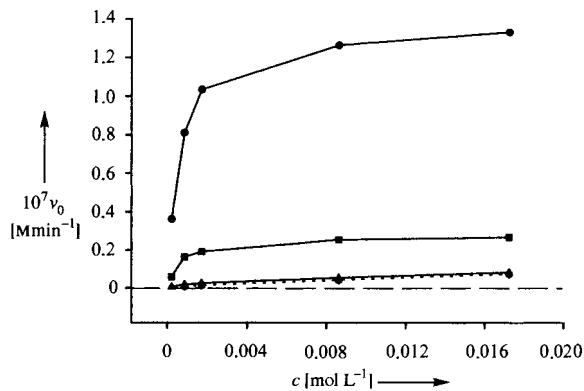


Abb. 1. Hydrolyse des Esters **2a** in einem 1:1-Gemisch aus wässrigem Puffer (pH = 7.6) und Acetonitril bei 21 °C in Gegenwart verschiedener Katalysatoren (aufgetragen ist die Anfangsgeschwindigkeit v_0 gegen die Substratkonzentration c): ● **1a**-geprägtes Polymer, ■ Benzoat-prägtes Polymer, ▲ Amidin **3b**, ● kein Katalysator.

Aus der doppelt-reziproken Lineweaver-Burk-Auftragung (Abb. 2) läßt sich eine hohe Substratbindung mit einer Michaelis-Konstanten $K_m = 0.60 \text{ mM}$ ermitteln; k_{cat} ist relativ klein ($0.8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), doch ist eindeutig ein Turnover vorhanden. Abbildung 2 zeigt auch, daß das Übergangszustandsanalogen **1a** ein sehr wirkungsvoller kompetitiver Hemmer ist und mit

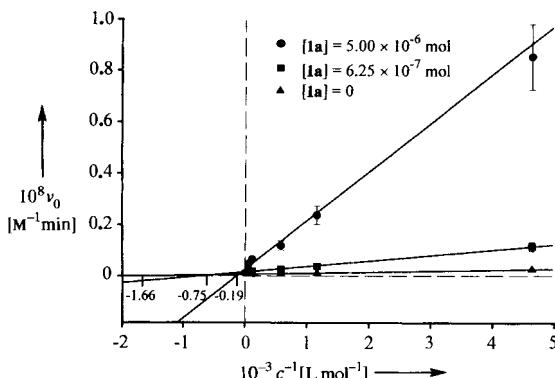


Abb. 2. Doppelt-reziproke Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit v_0^{-1} gegen die Substratkonzentration c^{-1} . Dabei sind in zwei Fällen unterschiedliche Konzentrationen des als kompetitiver Inhibitor wirkenden **1a** zugesetzt. Die Schnittpunkte bei $1/v_0 = 0$ ergeben die eingetragenen $-1/\alpha K_m$ -Werte, aus denen auch K_i ermittelbar ist.

$K_i = 0.025 \text{ mM}$ eine deutlich höhere Affinität hat als das Substrat. Leider ist auch das Produkt, die Homoterephthalsäure, ein kompetitiver Hemmer, weshalb der Turnover nicht deutlich größer ist.

Bemerkenswert ist auch die Selektivität der neuen Enzymmodelle. Tabelle 2 zeigt die Kreuzselektivität der mit **1a** und **1b** geprägten Polymere bei $\text{pH} = 9.0$. Werden beide Polymere für die Katalyse der basischen Hydrolyse von **2a** und **2b** eingesetzt, so hydrolysiert jedes Polymer sein „eigenes“ Substrat deutlich besser (1.3–1.5fach), obwohl beides Phenoester sind und somit die unterschiedlichen Hohlräume nur im Hinblick auf eine geringe Strukturänderung im Arenbereich geprägt worden sind.

Tabelle 2. Relative Geschwindigkeit der Hydrolyse von **2a** und **2b** katalysiert durch **1a**- und **1b**-geprägte Polymere ($\text{pH} = 9.0$).

Substrat	Lösung	1a -geprägt	1b -geprägt	Faktor
2a	1.0	17.6	11.8	1.5
2b	1.0	40.6	52.4	1.3

Experimentelles

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der geprägten Polymere: Zu einer Monomerlösung aus 87.6 Gew.-% Ethyldimethacrylat, 4.1 % Methylmethacrylat und 8.3 % **3a** wurde Matrizenmonomer **1a**, **1b** oder Benzosäure in einer Menge hinzugesetzt, daß auf **1a** oder **1b** je zwei Moläquivalente, auf die Benzosäure ein Moläquivalent **3a** kommen. Es wird 1 Gew.-% Azobisisobutyronitril zugesetzt und mit dem gleichen Volumen des als Porogen wirkenden Tetrahydrofuran verdünnt. Dann wird in der üblichen Weise bei 60°C 70 h polymerisiert und aufgearbeitet. Das Polymer wird in einer Soxhlethülse zunächst 24 h mit Methanol gewaschen, anschließend werden die Matrizen durch zweimaliges Äquilibrieren mit 0.1 N wäßriger NaOH /Acetonitril-Lösung (1:1) abgespalten. Die abgespaltene Menge Matrize wird mit HPLC bestimmt (ca. 90 % Abspaltung).

Hydrolysen: Es werden zu 5 mL Puffer/Acetonitril (1:1) [Phosphat-Puffer 7.0 und 7.6 sowie Glycin/ NaOH -Puffer 9.0] 500 μL einer 0.01 M Stammlösung von **2a** oder **2b** sowie eine entsprechende Menge interner Standard (Benzophenon oder Propiophenon) zugesetzt. Die Menge des Polymers wird auf die Anzahl freier Hohlräume bezogen. Die Hydrolyse bei 21°C wird mit HPLC an einer RP8-Säule (Detektion bei 238 nm) verfolgt und auf die Menge der gebildeten Homoterephthalsäure bezogen.

Ein eingegangen am 1. April 1997 [Z 10293]

Stichwort: Enzymmodelle · Hydrolyse · Imprinting · Katalyse · Polymere

[1] Übersicht: A. J. Kirby, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 770–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 705–724.

[2] a) L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375–1377; b) W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York, 1969.

- [3] Übersichten: P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 1336–1348; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1283–1295; R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *252*, 659–667.
- [4] G. Wulff, A. Sarhan, *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 364; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 341; G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *44*, 4329–4332; G. Wulff, A. Sarhan, DE-A 2242796, **1974** [Chem. Abstr. **1975**, *83*, P 60300w].
- [5] Übersichten: G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1958–1979; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1812–1832; K. J. Shea, *Trends Polym. Sci.* **1994**, *2*, 166–173; K. Mosbach, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 9–14.
- [6] D. K. Robinson, K. Mosbach, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 969–970; B. Sellergren, K. J. Shea, *Tetrahedron Asymmetry* **1994**, *5*, 1403–1406; K. Ohkubo, Y. Funakoshi, T. Sagawa, *Polymer* **1996**, *37*, 3993–3995, zit. Lit.
- [7] J. V. Beach, K. J. Shea, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 379–380; J. Matsui, I. A. Nicholls, I. Karube, K. Mosbach, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5414–5417.
- [8] J. D. Stewart, L. J. Liotta, S. J. Benkovic, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 396–404.
- [9] G. Wulff, R. Schönfeld, M. Grün, R. Baumstark, G. Wildburg, L. Häubling (BASF AG), Dtsch. Patent angemeldet, **1996**.
- [10] Die umgekehrte Wechselwirkung mit Acrylsäure als Haftgruppe für Bisamidine wurde bereits beim Prägen verwendet: B. Sellergren, *J. Chromatogr. A.* **1994**, *673*, 133–141.
- [11] G. Wulff, R. Schönfeld, unveröffentlicht.

Ein (Polyoxo)(polyolato)tantal (v)-Komplex mit einem doppeladamantanartigen $[\text{Ta}_7\text{O}_{12}]^{11+}$ -Kern **

Kaspar Hegetschweiler,* Thomas Raber, Guido J. Reiß, Walter Frank, Michael Wörle, Antonio Currao, Reinhard Nesper und Thomas Kradolfer

Frühe Übergangselemente wie V, Nb, Ta, Mo und W haben in ihrer höchsten Oxidationsstufe in wässrigem Medium eine ausgeprägte Neigung zur Bildung von mehrkernigen, oxoverbrückten Aggregaten.^[1] Die Polyoxometallat-Ionen $[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{6-}$, $[\text{M}_6\text{O}_{19}]^{8-}$ ($\text{M} = \text{Nb}, \text{Ta}$), $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$, $[\text{Mo}_8\text{O}_{26}]^{4-}$ und $[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]^{6-}$ sind schon seit vielen Jahren bekannt. Solche mehrkernigen Komplexe werden heute intensiv untersucht, da sie im Ablauf einer fortgesetzten Vernetzung den Übergang vom einkernigen Ion zum festen Metalloxid repräsentieren.^[2] Es stellt sich insbesondere die Frage, ob in den diskreten Teilchen in Lösung bereits das Bauprinzip des resultierenden Festkörpers erkennbar ist. Mehrkernige Oxo-Komplexe mit einem neuartigen Strukturtyp sind von besonderem Interesse, da sie einen Zugang zu neuen Materialien ermöglichen können. Wir haben vor kurzem gezeigt, daß sich Polyalkohole mit einer tripodalen Struktur dazu eignen, in Lösung mehrkernige Oxo-Komplexe zu stabilisieren,^[3] indem sie als periphere Schutzliganden den Komplex abschirmen und dadurch eine weitergehende Aggregation verhindern. Diese Strategie wurde nun benutzt, um ausgehend vom einkernigen $[\text{Ta}(\text{tdci})_2]^{5+}$ ($\text{1, tdci} = 1,3,5\text{-Tridesoxy-1,3,5-tris (dimethylamino)-cis-inositol}$) einen sie-

[*] Prof. Dr. K. Hegetschweiler, Dr. T. Raber
Universität des Saarlandes, Fachrichtung Anorganische Chemie
Postfach 151150, D-66041 Saarbrücken
Telefax: Int. +681/302-2663
E-mail: hegetsch@rz.uni-sb.de

Dr. G. J. Reiß, Prof. Dr. W. Frank

Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern

Dr. M. Wörle, Dr. A. Currao, Prof. Dr. R. Nesper, Dr. T. Kradolfer
Laboratorium für Anorganische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (Schweiz)

[**] Metallkomplexe von Polyalkoholen, 5. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der ETH Zürich durch Kredite für Unterricht und Forschung gefördert. – 4. Mitteilung: [3]