

# Antikörper als Katalysatoren

Von Peter G. Schultz\*

Das unermessliche Bindungsrepertoire des Immunsystems kann ausgenutzt werden, um maßgeschneiderte biologische Katalysatoren zu erzeugen. Katalytisch aktive Antikörper, mit denen sich eine Fülle von Reaktionen mit exquisiter Spezifität ausführen lassen, sind nach mehreren Methoden zugänglich. Die Erzeugung und Charakterisierung dieser neuartigen Katalysatoren ermöglicht nicht nur neue Einsichten in die Natur der molekularen Erkennung und der Katalyse selbst, sondern dürfte auch einen Anstoß zur Entwicklung weiterer neuartiger Katalysatoren für chemische, biologische und medizinische Anwendungen geben.

## 1. Einleitung

Die Synthese von Katalysatoren mit maßgeschneiderten Spezifitäten und Eigenschaften stellt sowohl für Chemiker als auch für Biologen eine Herausforderung dar. Eine Schlüsselrolle beim Entwurf von enzymähnlichen Katalysatoren nimmt die Gestaltung von Rezeptoren ein, die vorgegebene Liganden unterscheiden, d. h. mit hoher Selektivität binden können. Um dieses Problem zu lösen, hat man sich bis heute meistens auf Synthese und Funktionalisierung von Wirtmolekülen mit kleinen Kavitäten sowie auf die Änderung der naturgegebenen Spezifität von Enzymen durch chemische Modifikation oder durch gezielte genetische Mutagenese konzentriert.

Dank der Hybrid-Technologie<sup>[1]</sup> ist es nun möglich, einheitliche Immunglobuline zu erzeugen, deren Bindungsstellen eine große Anzahl strukturell verschiedener Liganden mit hoher Affinität und Selektivität komplexieren können. So konnten zum Beispiel Antikörper gegen große Biopolymere wie Nucleinsäuren, Peptide und Polysaccharide, gegen Naturstoffe wie Steroide und Prostaglandine und gegen kleine synthetische Verbindungen wie zum Beispiel Phenylphosphonate und Benzylamine gewonnen werden. Die Fähigkeit des Immunsystems zur Produktion solcher spezifischer Antikörper führte zu deren breiter Verwendung 1) in der Therapie und als Kontrastmittel, 2) als Diagnosehilfen sowie 3) als Sonden für Isolierung und Strukturaufklärung von komplexen Biomolekülen<sup>[1b, 2]</sup>.

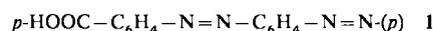
Gerade weil Immunglobuline (Antikörper) gegen beinahe jede interessierende Verbindung erhalten werden können, kommt der Entwicklung allgemeiner Methoden zur Einführung katalytischer Aktivität in ihre Bindungsstellen große Bedeutung zu. Dies würde nämlich zu einer neuen Klasse von enzymähnlichen Katalysatoren mit den geforderten *maßgeschneiderten Spezifitäten* führen. Katalytisch aktive Antikörper könnten wertvolle Dienste als biochemische oder molekularbiologische Werkzeuge, als therapeutische Mittel oder als Hilfen bei der Synthese von Pharmaka und anderen neuen Stoffen erweisen. Bis heute sind zwei allgemeine Routen zur Herstellung von katalytisch aktiven Antikörpern eingeschlagen worden: Einerseits wurde die sterische und elektronische Komplementarität eines Antikörpers zum entsprechenden Hapten (der Ligand, gegen welchen der Antikörper erzeugt wurde) ausgenutzt, um Bindungsstellen zu

erzeugen, welche 1) komplementär zum geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustand sind, 2) als Templat zur Überwindung der entropischen Barriere durch Orientierung der Reaktionspartner dienen, 3) eine korrekt positionierte katalytisch aktive Aminosäure-Seitenkette enthalten oder 4) Bindungsstellen für Cofaktoren aufweisen. Andererseits konnten katalytisch wirkende funktionelle Gruppen auch direkt durch chemische Modifikation, durch ortsspezifische Mutagenese oder durch genetische Selektion in die Bindungsstelle eingebracht werden. Antikörper, die mit solchen Gruppierungen und/oder Mikroumgebungen ausgerüstet sind, können nicht nur spezifische Reaktionen katalysieren, sondern auch helfen, die Beiträge der an der enzymatischen Katalyse beteiligten Faktoren wie etwa Stabilisierung des Übergangszustands, generelle Säure-Basen-Katalyse, nucleophile Katalyse, Grundzustandsspannung sowie Nachbargruppeneffekte aufzuschlüsseln.

## 2. Herstellung, Struktur und Funktion von Antikörpern

### 2.1. Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Ligand

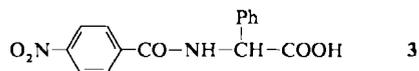
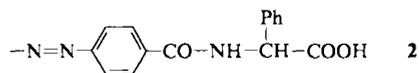
Ein großer Teil unserer derzeitigen Kenntnisse über die Natur der Antikörper-Ligand-Wechselwirkung beruht auf Messungen der Affinitäten von heterogenen polyklonalen Antikörpern zu einer Reihe von Haptenen (Substanzen, welche erst nach Kupplung an ein Trägermolekül immunogen werden) definierter Struktur<sup>[3]</sup>. Die hohe Spezifität von Antihapten-Antikörpern kann durch experimentelle Beispiele illustriert werden. So wurden etwa polyklonale Antikörper gegen die Gruppe (das Hapten) 1



(im biochemischen Sprachgebrauch *p,p'*-Azophenylazobenzoat) erzeugt, die als Konjugat mit dem Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA) vorlag<sup>[4]</sup>. Es wurde nun geprüft, ob diese Antikörper auch an analoge Haptene binden; durch Messungen der Fällungsinhibition ließ sich die relative mittlere Bindungsaffinität ermitteln<sup>[5]</sup>. Diese Antikörper komplexierten Sulfonat-(SO<sub>3</sub><sup>⊖</sup>), Phosphonat-(PO<sub>3</sub>H<sup>⊖</sup>), Arsonat-(AsO<sub>3</sub>H<sup>⊖</sup>) oder Hydroxy-(OH)-substituierte Arene deutlich schlechter als Arene mit dem planaren Anion Carboxylat. Außerdem verhinderten weder Acetat noch Cy-

[\*] Prof. Dr. P. G. Schultz  
Department of Chemistry, University of California  
Berkeley, CA 94720 (USA)

clohexancarboxylat die Fällungsreaktion – ein Indiz für die Spezifität des Antikörpers für den planaren Phenylring. *Karush* zeigte, daß polyklonale Antikörper, welche gegen die D-konfigurierte Azoverbindung **2** gerichtet sind, die L-Verbindung **3** ungefähr 200mal schwächer binden als deren D-Isomer<sup>[4b]</sup>.



Bei der Erkennung von Haptene durch Antikörper spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Wie *Pressman* et al. durch chemische Modifikation zeigten, sind in der Bindungsstelle von Antikörpern gegen die  $\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-N=N-}$  („Azobenzoat“-)Gruppe positiv geladene Arginin- und Lysinreste vorhanden. Umgekehrt konnte die Anwesenheit von Carboxylatgruppen in Antikörpern, welche spezifisch die *p*-Trimethylammoniumphenylazo- („*p*-Azobenzoltrimethylammonium“-)Gruppe binden, nachgewiesen werden<sup>[6]</sup>. Auch hydrophobe Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken tragen entscheidend zur Antikörper-Hapten-Erkennung bei. So ist aus NMR-Experimenten bekannt, daß es im Anti-2,4-dinitrophenyl(DNP)-Antikörper MOPC315 zu einer  $\pi$ -Stapelwechselwirkung zwischen dem Indolring eines Tryptophanrestes und dem Benzolring des Haptens kommt<sup>[7]</sup>. In einem Antilysozym-Antikörper konnte durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden, daß Wasserstoffbrücken einen wichtigen Beitrag zur Bindung von Lysozym leisten<sup>[8]</sup>. Dasselbe gilt auch für die Erkennung von Phosphorylcholin durch den Antikörper McPC603<sup>[9]</sup>.

Immunglobuline binden in der Regel Liganden mit einer Größe von 6 bis 34 Å mit Assoziationskonstanten zwischen  $10^4$  und  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ <sup>[3]</sup>. Die Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion des Haptens mit dem Immunglobulin bewegen sich typischerweise im Bereich von  $10^7$  bis  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ <sup>[10]</sup>, während die Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion beträchtlich variieren können. Beim Anti-DNP-Antikörper MOPC315 beispielsweise betragen sie etwa  $1.1 \text{ s}^{-1}$  für  $\epsilon$ -DNP-Lysin und etwa  $1300 \text{ s}^{-1}$  für DNP-Glycin<sup>[10]</sup>.

## 2.2. Struktur von Immunglobulinen

Immunglobuline sind relativ große Moleküle (150 000 Dalton für ein IgG-Monomer) und bestehen aus vier Polypeptidketten: zwei identischen schweren Ketten mit einem Molekulargewicht von 50 000 und zwei identischen, via Disulfid-Bindungen an die schweren Ketten gekuppelten leichten Ketten mit einem Molekulargewicht von 25 000<sup>[11]</sup>. Die leichten Ketten sind in die beiden Domänen  $V_L$  (variabel) und  $C_L$  (konstant) unterteilt, während die schweren Ketten aus  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ -Domänen bestehen. Aminosäuresequenzanalysen zeigten, daß sowohl leichte als auch schwere Ketten derselben Klasse von Antikörpern eine konstante Sequenz im  $C_L$ - und  $C_H$ -Bereich haben; dagegen sind die  $V_L$ - und  $V_H$ -Regionen individuell und für jeden einzelnen Antikörper hochgradig polymorph. Die Bindungsstelle der Immunglobuline (IgG) für Antigene besteht aus sechs hypervariablen Regionen (Regionen mit sehr unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung) und wird etwa aus den ersten 110 Aminosäuren der leichten ( $V_L$ ) und schweren ( $V_H$ ) Kette gebildet<sup>[11]</sup> (Abb. 1). Durch Zusammenfügen der Gensegmente, welche für die  $V_L$ - und  $V_H$ -Ketten codieren, sowie durch Zusammenfügen der verschiedenen leichten Ketten mit den verschiedenen schweren Ketten ergibt sich unter Ausnutzung aller kombinatorischen Möglichkeiten eine Molekülvielfalt von ca.  $10^8$  Individuen. Durch Mutationen (somatische Mutation) wird das Basisrepertoire der Rezeptoren noch drastisch erweitert<sup>[12]</sup>. Die proteolytische Spaltung eines Immunglobulins mit Papain ergibt ein  $F_{ab}$ -Fragment, welches sowohl die intakte leichte Kette als auch die  $V_H$ - und  $C_{H1}$ -Region der schweren Kette enthält (Abb. 1).

Die strukturelle Basis der Bindungsaffinität und -spezifität von Antikörpern konnte durch Röntgenstrukturanalyse, ESR- und NMR-Studien mit spinmarkierten Haptene sowie durch Affinitätsmarkierung sondiert werden. Die hochauflösende Röntgenstrukturanalyse hat es ermöglicht, die dreidimensionale Struktur einer Anzahl von Antikörper- $F_{ab}$ -Fragmenten aufzuklären. Dazu zählen der Komplex des  $F_{ab}$ -Fragmentes des Myelomproteins McPC603 mit Phosphorylcholin<sup>[9]</sup>, des  $F_{ab}$ -Fragmentes des menschlichen Proteins New mit einem Vitamin-K-Derivat<sup>[13]</sup>, der  $F_{ab}$ -Fragmente von zwei Immunglobulinen mit Lysozym<sup>[8]</sup>, eines  $F_{ab}$ -



*Peter G. Schultz promovierte 1983 bei Prof. Peter Dervan (California Institute of Technology), arbeitete 1984 als NIH-Postdoktorand bei Prof. Christopher Walsh (Massachusetts Institute of Technology) und ist seit 1985 an der University of California, Berkeley, tätig; 1987 wurde er zum Associate Professor und 1989 zum Professor of Chemistry ernannt. Sein Forschungsprogramm betrifft die Mechanismen der molekularen Erkennung und der Katalyse sowie die Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse auf das Design hochselektiver Katalysatoren für chemische, biologische und medizinische Zwecke. Dazu gehören auch die Erzeugung katalytisch wirksamer Antikörper, die Entwicklung neuer Mutagenese-Methoden zur selektiven Einführung unnatürlicher Aminosäuren in Proteine und der Entwurf sequenzspezifischer Nucleasen für große RNAs und DNAs. Peter G. Schultz wurde mehrfach ausgezeichnet, u. a. mit dem ACS Nobel Laureate Signature Award, dem NSF Waterman Award und dem ACS Award in Pure Chemistry. Er ist NSF Presidential Young Investigator, Searle Scholar und Alfred P. Sloan Fellow, außerdem Mitbegründer des Affymax Research Institute zur Entwicklung von Arzneimitteln.*

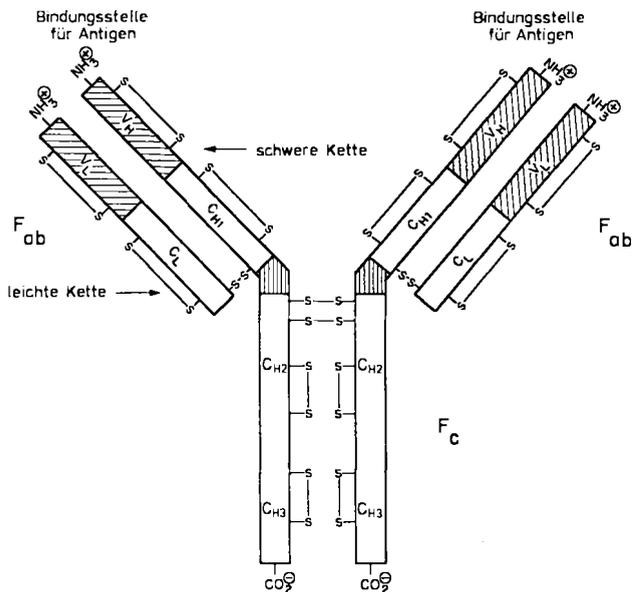


Abb. 1. Struktur von Immunglobulinen (Antikörpern), schematisch. Die CDR1-Region ist das „Scharnier“ der schweren Ketten.

Fragmentes mit dem viralen Protein Neuraminidase<sup>[14]</sup> sowie des F<sub>ab</sub>-Fragmentes Kol<sup>[15]</sup>.

### 2.3. Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Bis heute beschäftigten sich die Arbeiten über katalytisch aktive Antikörper ausschließlich mit der Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Ein monoklonaler Antikörper ist eine einzelne Spezies mit definierter Affinität und Spezifität zum entsprechenden Hapten<sup>[1]</sup>. Präparationen polyklonaler Antikörper hingegen bestehen aus einer großen Anzahl verschiedener Moleküle gegen ein und dasselbe Hapten. Solche Präparationen können sich in Affinität und Spezifität unterscheiden, und die Zusammensetzung kann variieren. Es ist deshalb sinnvoller (und auch aussagekräftiger), die katalytischen Eigenschaften monoklonaler Antikörper und nicht die gemittelten Eigenschaften eines polyklonalen Gemisches zu charakterisieren. Überdies ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in hohem Maße reproduzierbar und im Gramm-Maßstab durchführbar.

Das Prozedere zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist in Abbildung 2 skizziert<sup>[1]</sup>. Nachdem eine Immunantwort gegen das gewünschte Antigen erreicht worden ist, werden antikörperproduzierende Plasmazellen der Milz mit unsterblichen Zellen eines Myeloms fusioniert (oder hybridisiert). Dieser Schritt bewirkt, daß die antikörperproduzierenden Zellen kultiviert und zu unendlicher Vermehrung veranlaßt werden können. Diese Hybride werden anschließend geklont oder in Kolonien von Zellen, welche nur einen Antikörpertyp produzieren, aufgeteilt. An solchen Zell-Linien kann mit der ELISA-Technik überprüft werden, ob sie Antikörper produzieren, welche selektiv und mit hoher Affinität das gewünschte Hapten binden (Abb. 3)<sup>[16]</sup>.

Da kleine Haptene erst dann immunogen wirken, wenn sie an ein Trägermolekül gekuppelt sind, wurden alle in dieser Übersicht beschriebenen Haptene an die Trägerproteine Rinderserumalbumin (BSA) und Napfschneckenhämocyanin (Keyhole limpet hemocyanine, KLH) gebunden. Die Länge des „Armes“, welcher das Hapten mit dem Protein

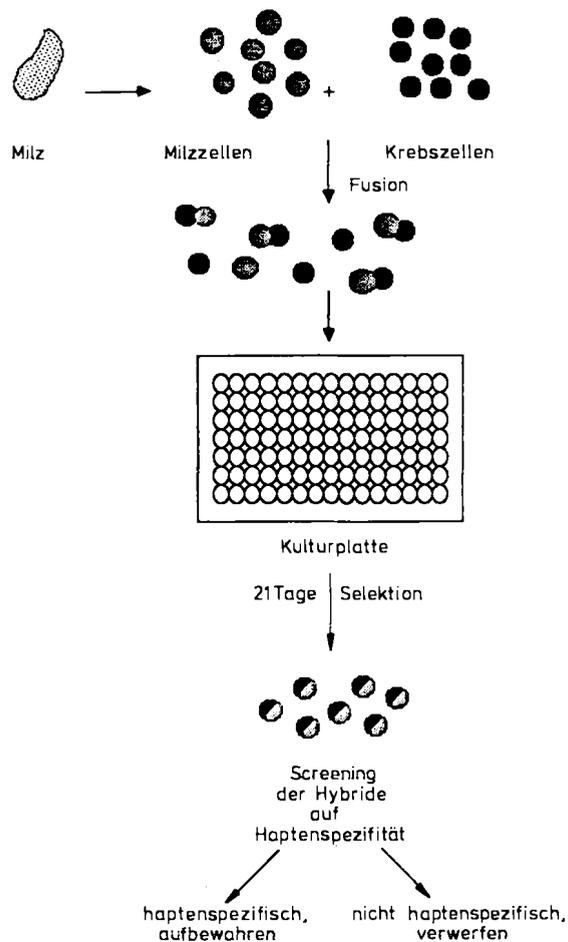


Abb. 2. Schritte zur Herstellung monoklonaler Antikörper.

verknüpft, beträgt etwa 6 bis 8 Å. Dies ist lang genug, um jegliche sterische Komplikationen mit Seitenketten des Trägerproteins auszuschließen<sup>[17]</sup>. Im allgemeinen wurden die Haptene mit dem wasserlöslichen Kupplungsreagens *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl carbodiimid oder als *N*-Hydroxysuccinimidester bei pH 5.5 in Wasser kovalent an die Proteine BSA und KLH gekuppelt<sup>[17]</sup>. Andere Kupplungs-

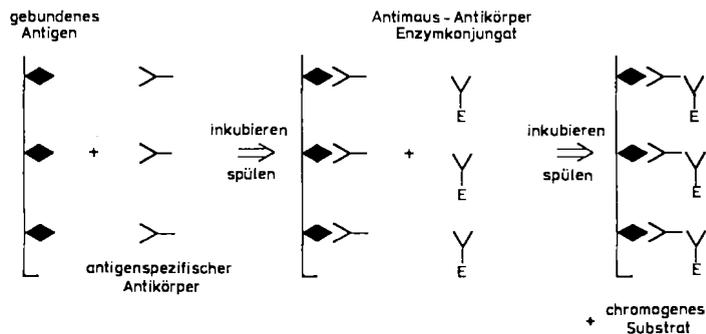


Abb. 3. Technik des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Screening von Antikörpern auf Selektivität und hohe Affinität.

strategien enthalten Disulfid-Austauschreaktionen, elektrophile aromatische Substitution mit Diazoniumsalzen und reduktive Aminierungsreaktionen<sup>[17]</sup>. Normalerweise wurden unter diesen Bedingungen 8 bis 15 Haptenmoleküle an ein Trägerproteinmolekül gebunden.

Mäuse der Stämme Balb/c, Swiss Webster oder AJ1 wurden mit den KLH-Hapten-Konjugaten (emulgiert in *Freunds*

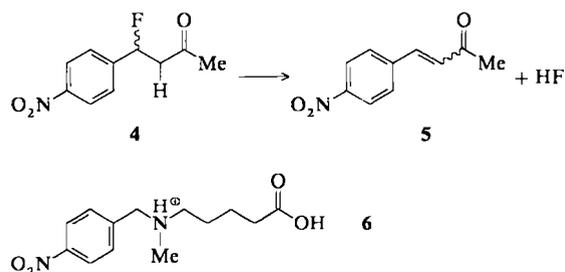
komplettem Adjuvans) immunisiert<sup>[18]</sup>. Für die Zellfusionen, nach Standardmethoden, dienten Sp2/O-Myelomzellen als Fusionspartner<sup>[19]</sup>. Die Antikörper wurden mit der ELISA-Technik geprüft, ob sie an das BSA-Hapten-Konjugat binden, ob freies Hapten die Bindung inhibiert und ob die Bindung an das freie Protein KLH unterbleibt. Durch Affinitätschromatographie der Ascitesflüssigkeit an Protein A<sup>[20]</sup> oder durch Mono-Q-Ionen-Austauschchromatographie konnten die Immunglobuline gereinigt und durch denaturierende 12% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Homogenität untersucht werden<sup>[73]</sup>.

### 3. Katalytisch aktive Antikörper

#### 3.1. Herstellung von Antikörpern mit katalytisch wirkenden Aminosäure-Seitenketten in den Bindungsstellen

##### 3.1.1. Hapten-Antikörper-Komplementarität

**Eine  $\beta$ -Eliminierungsreaktion:** Eine Möglichkeit, um katalytisch wirkende funktionelle Gruppen (zum Beispiel basische oder saure Aminosäure-Seitenketten) in die Bindungsstelle einzubringen, besteht in der Erzeugung von Antikörpern gegen ein Hapten, dessen Struktur komplementär zur katalytisch aktiven Gruppe ist. In der Tat ist die Ableitung von allgemeinen Regeln, welche die Haptenstruktur mit der Struktur der entsprechenden katalytisch wirksamen Gruppen oder mit der Mikroumgebung der Bindungsstelle korrelieren, ein wichtiges Ziel bei der Gestaltung von Antikörper-Katalysatoren. So wurde zum Beispiel die elektrostatische Komplementarität zwischen Hapten und Antikörper ausgenutzt, um eine Aminosäure-Seitenkette zu erzeugen, die dann die  $\beta$ -Eliminierungsreaktion  $4 \rightarrow 5$ <sup>[21]</sup> katalysierte. Diese Reaktion, bei welcher ein kohlenstoffgebun-



denes Proton abstrahiert wird, gehört zu einer Klasse chemischer Umsetzungen, deren wichtigste Vertreter Eliminierungen und Isomerisierungen sowie Aldol- und Claisen-Kondensationen sind. Bei Enzymen, welche solche Reaktionen katalysieren, wird die Protonabstraktion meist durch die Carboxylatgruppe einer Glutaminsäure- oder Asparaginsäure-Seitenkette ausgeführt. Solche Reste im hydrophoben aktiven Zentrum von Enzymen weisen im allgemeinen einen  $pK_a$ -Wert auf, der höher liegt als normal<sup>[22]</sup>.

Aspartat- und Glutamatreste konnten in der Bindungsstelle von Antikörpern unter Ausnutzung der Ladungskomplementarität zwischen Hapten und zugehörigem Antikörper erzeugt werden<sup>[6]</sup>. Daraus schlossen wir, daß sich mit einem positiv geladenen Hapten möglicherweise eine Bin-

dingsstelle im Antikörper herstellen läßt, in der die Carboxylatgruppe und ein abstrahierbares Substratproton eng genug benachbart für eine chemische Bindung sind. Dabei ist es wichtig, daß die geladene Gruppe des Haptens die gleiche Position wie die zu deprotonierende C-H-Gruppe des Substrates einnimmt. Das Hapten **6** enthält eine Ammoniumgruppe an der Stelle, an welcher sich die  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Substrates **4** befindet. Die Tatsache, daß sowohl das Hapten als auch das Substrat ein gemeinsames Erkennungsmerkmal haben, die *p*-Nitrophenylgruppe, sollte eine akzeptable Bindungsaffinität des Substrates an die Antikörper gewährleisten. Überdies sollte der Ersatz des Haptens in der Bindungsstelle durch ein Substratmolekül den  $pK_a$ -Wert der katalytisch aktiven Carboxylat-Seitenkette als Kompensation für den Verlust einer stabilisierenden Salzbrücke ansteigen lassen.

Von sechs Antikörpern, die gegen das KLH-Konjugat von **6** hergestellt wurden, katalysierten vier die  $\beta$ -Eliminierung  $4 \rightarrow 5$ . Das Immunglobulin IgG 43D4-3D3 folgte der klassischen Michaelis-Menten-Gleichung [Gl. (1)] ( $k_{cat} = 0.2 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m = 182 \mu\text{M}$  bei 37 °C und pH 6.0), zeigte Substratspezifität und konnte durch das Hapten kompetitiv inhibiert werden ( $K_i = 290 \text{ nM}$ ).

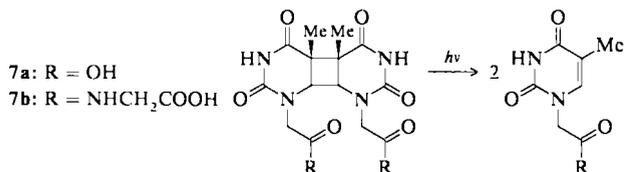


$$v = \frac{k_{cat} [\text{E}_T] [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}, \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

Dieser Antikörper wurde chemisch mit dem carboxylat-spezifischen Reagens Diazoacetamid in Gegenwart und in Abwesenheit von gebundenem Hapten modifiziert. Diese Experimente ergaben, daß eine Glutamat- oder Aspartat-Seitenkette für die katalytische Aktivität maßgeblich ist. Die Bestimmung von  $k_{cat}$  als Funktion des pH-Wertes in Gegenwart von gebundenem Substrat ließ auf einen  $pK_a$ -Wert der Carboxylatgruppe von 6.2 schließen. Dieser hohe Wert ist konsistent mit dem Verlust einer Salzbrücke beim Ersatz des Haptens **6** durch Substrat im Antikörper-Substrat-Komplex. Die in diesen Komplex eingeführte Carboxylat-Seitenkette erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit relativ zu derjenigen in Gegenwart von freiem Acetat in Lösung bei pH 6.0 um einen Faktor  $8.80 \times 10^4$ . Dieser Wert ähnelt der enzymbedingten Geschwindigkeitserhöhung um einen Faktor  $10^4$ , die im Falle der Staphylokokkennuclease der Base Glu 43<sup>[23]</sup> und im Falle von Trypsin der Base Asp 102<sup>[24]</sup> zugeschrieben wird.

**Eine [2 + 2]-Cycloreversionsreaktion:** Wiederum wurde eine Haptenstruktur ausgenutzt, um eine katalytisch aktive Seitenkette in einem Antikörper zu erzeugen. Dieser modifizierte Antikörper katalysiert die lichtabhängige [2 + 2]-Cycloreversion des Thymindimers **7a**<sup>[25]</sup>. Thymindimere sind die hauptsächlichsten, durch UV-Licht induzierten Photoläsionsprodukte in der DNA. Nach Modellstudien können Photosensibilisatoren wie Indole, Chinone oder Flavine reversibel ein Elektron an ein Thymindimer abgeben oder von ihm aufnehmen; dadurch wird das intermediäre Thymindimer-Radikal leicht gespalten<sup>[26-28]</sup>. Diese Resultate führten uns zur Hypothese, daß eine Bindungsstelle im Antikörper, welche thymindimer-spezifisch ist und zugleich einen korrekt positionierten Sensibilisator enthält, möglicherweise wie ein Photoreparaturenzym wirken könnte. In Analogie zu den Immunglobulinen, welche gegen positiv geladene Haptene gerichtet sind und einen komplementären Aspartat- oder

Glutamatrest aufweisen<sup>[3]</sup>, erwarteten wir, daß die Antikörper dem polarisierten  $\pi$ -System dieses Pyrimidindimers einen komplementären Tryptophanrest entgegenstellen würden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Antikörper gegen das *cis,syn*-Thymindimer **7b** hergestellt.



Fünf von sechs Antikörpern, welche durch Immunisierung gegen das KLH-Konjugat des Dimers **7b** erhalten wurden, katalysierten die Photoreversion des Dimers **7a** zum entsprechenden Monomer bei Bestrahlung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 300 nm. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$  von IgG 29E5 betrug  $1.2 \text{ min}^{-1}$  (bei nicht sättigender Lichteinwirkung). Dieser Wert liegt nahe bei  $k_{cat} = 3.4 \text{ min}^{-1}$  für das Reparaturenzym *Escherichia coli*-DNA-Photolyase, welches das Thymindimer spaltet<sup>[29]</sup>. Als Quantenausbeute der photolytischen Spaltung, bezogen auf die Anzahl vorhandener Tryptophanreste, ergab sich  $\Phi \geq 0.75$ ; der entsprechende Wert der DNA-Photolyase beträgt ungefähr 1.0. Die hohe Substratspezifität dieses Antikörpers manifestierte sich in der mangelnden katalytischen Aktivität gegenüber dem *N,N'*-Dimethylderivat. Die Abhängigkeit der Quantenausbeute von der Wellenlänge sowie Ergebnisse von Fluoreszenzlöschungsexperimenten wiesen auf die Beteiligung eines Tryptophanrestes an der Katalyse hin. Durch Pulsradiolyseexperimente konnte gezeigt werden, daß (Methylthymine)dimer- und (Dimethylthymine)dimer-Radikalanionen mit einer Frequenz von 0.05 zu Monomeren zerfallen<sup>[30]</sup>. Da nun die Quantenausbeute der antikörpersensibilisierten Reaktion beträchtlich höher ist als 0.05, scheint das Immunoglobulin am Zerfall des intermediären Radikalions beteiligt zu sein. Um den Mechanismus dieser antikörperkatalysierten Reaktion im Detail aufzuklären, werden zur Zeit weitere Experimente ausgeführt.

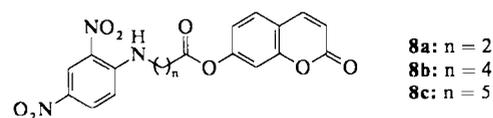
In den beiden oben angeführten Beispielen war ein hoher Prozentsatz der isolierten Antikörper katalytisch aktiv. Dies könnte bedeuten, daß die Ausnutzung von elektrostatischen und  $\pi$ -Stapelungswechselwirkungen zur Erzeugung komplementärer Bindungsstellen von allgemeiner Bedeutung ist. Die Erzeugung von Antikörpern, die Beschleunigungen in der Größenordnung von  $10^8$  oder mehr bewirken, wird wahrscheinlich die gleichzeitige Anwendung von zwei oder mehreren Strategien zur Einführung der katalytischen Aktivität in die Antikörper erfordern. Selbstverständlich sind dabei Strategien wie die oben beschriebenen, die zu einem hohen Prozentsatz an katalytisch wirksamen Antikörpern (bezogen auf die Gesamtzahl der isolierten haptenspezifischen Antikörper) führen, am wünschenswertesten und am leichtesten zu verallgemeinern. Es sind viele andere Reaktionen denkbar, welche unter Anwendung der obigen (oder in Verbindung mit der in Abschnitt 3.1.2 erläuterten) Strategie antikörperkatalysiert ablaufen könnten: so zum Beispiel Aldolreaktionen (mit einem  $\beta$ -Aminophosphonat-Hapten), Ester/Amid-Hydrolysen (mit einem *N*-Oxid-Hapten) oder Oxy-Cope-Umlagerungen (mit einem Aminocyclohexan-Hapten). Es sei hier angemerkt, daß es auch monoklonale Antikörper gibt, deren nucleophile Reste zufälligerweise stö-

chiometrisch mit einem aktivierten Esteranalogon des entsprechenden Haptens reagieren<sup>[31]</sup>.

### 3.1.2. Ortsspezifische Mutagenese

Einen anderen Weg zur Einführung von katalytisch aktiven Gruppen in die Bindungsstelle eines Antikörpers eröffnet die Technik der ortsspezifischen Mutagenese, wie am Beispiel des Immunoglobulins MOPC315 gezeigt wurde<sup>[32]</sup>. MOPC315 bindet 2,4-Dinitrophenylderivate mit Assoziationskonstanten von  $10^{-3}$  bis  $10^{-7} \text{ M}^{-1}$ <sup>[33,34]</sup>. Die Bindungsstelle wurde spektroskopisch (UV, Fluorometrie, NMR), durch chemische Modifikation und durch Sequenzanalyse der variablen Regionen charakterisiert. Außerdem ist durch ältere Affinitätsmarkierungsstudien mit unterschiedlichen Verbindungen bekannt, daß in der Nähe des Bindungszentrums eine definierte Anzahl von reaktiven Aminosäure-Seitenketten vorliegt.

Da keine Röntgenstrukturanalyse von MOPC315 existiert, dienten Experimente zur chemischen Modifikation als Leitlinien für die spezifische Mutagenese. Obwohl 14 potentiell reaktive Seitenketten in der hypervariablen Region vorhanden sind (2 Histidin-, 2 Lysin-, 3 Arginin- und 7 Tyrosinreste), wurden vorwiegend nur zwei davon, nämlich Tyrosin 34L und Lysin 52H, durch DNP-enthaltende Affinitätsmarker alkyliert<sup>[35]</sup>. Tyrosin 34L wurde als erstes Ziel für die Mutagenese ausgewählt, weil ein Histidin an dieser Stelle geeignet schien, um die Hydrolyse der Ester **8a-c** zu katalysieren. Die Beteiligung von Tyrosin 34L beim Binden von DNP-Derivaten wurde bisher nicht genau eruiert. Es ist jedoch bekannt, daß Affinitätsmarkierung dieses Tyrosinrests zum entsprechenden 5-Mercapto-2-oxopentylether das Binden von Liganden, wahrscheinlich durch sterisches Blockieren des Einganges zur Bindungstasche, verhindert. Die Nitrierung des Tyrosinringes hat keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften<sup>[36]</sup>. Es wurde auch Phenylalanin eingebaut, um den Beitrag der Hydroxygruppe von Tyrosin zur Haptenbindung zu untersuchen.



Um Mutanten des Antikörpers MOPC315 herzustellen, beschlossen wir, seine variable Region ( $F_v$ ) in *E. coli* zu exprimieren. MOPC315-IgA kann mit Pepsin proteolytisch in die funktionellen  $F_{ab}$ - oder  $F_v$ -Fragmente gespalten werden<sup>[37]</sup>. Das  $F_v$ -Fragment (26 kD) ist ein Heterodimer aus zwei Peptiden, nämlich  $V_H$  (14 kD) und  $V_L$  (12 kD) (siehe auch Abb. 1). Es enthält alle nötigen Sequenzen zur korrekten Faltung der Bindungsstelle und zur Erkennung der DNP-Haptene. Reduzierte und getrennte  $V_H$ - und  $V_L$ -Peptide von MOPC315 sowie von mehreren anderen Antikörpern können zu einem stabilen funktionellen  $F_v$ -Fragment rekombiniert werden (Abb. 4)<sup>[37]</sup>. Die Disulfidbrücke in  $V_L$  oder  $V_H$  kann vor der Rekonstitution sehr effizient durch Oxidation der reduzierten Form gebildet werden<sup>[37]</sup>. Die Einfachheit und die Wirksamkeit der Rekonstitution macht das Fragment  $F_v$  zu einem begehrten Ziel der Expression einer Antikörper-Bindungsstelle in *E. coli*. Wir haben diese Eigenschaften ausgenutzt, um Hybrid- $F_v$ -Fragmente herzustellen, in welchen rekombinantes  $V_L$ , exprimiert in *E. coli* mit  $V_H$

von MOPC315-IgA vereint wurde. Funktionelle  $F_v$ - und  $F_{ab}$ -Fragmente anderer Antikörper wurden kürzlich in *E. coli* exprimiert<sup>[38]</sup>. Ein Gen, welches für die 115 N-terminalen Aminosäuren der leichten Kette von MOPC315 codiert, wurde chemisch synthetisiert und in *E. coli* als Fusionsprodukt mit dem Lambda-cII-Gen exprimiert<sup>[39]</sup>. Das entstandene Hybridprotein wurde mit Faktor Xa an einer einzigen Stelle gespalten, das so erhaltene freie  $V_L$ -Peptid mit  $V_H$  rekonstituiert und das resultierende  $F_v$ -Fragment durch Gelfiltration und Affinitätschromatographie gereinigt.

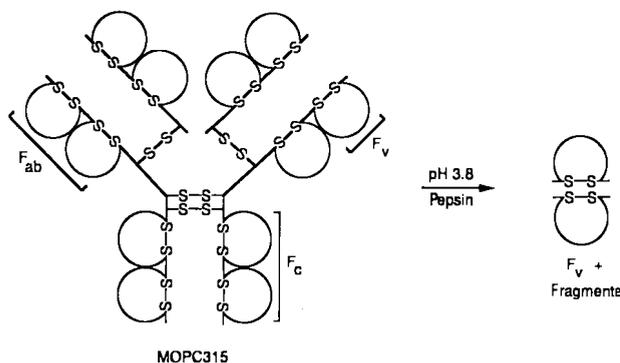


Abb. 4. Struktur des Antikörpers MOPC315, schematisch, und seine Zersetzung durch Pepsin.

Wildtyp- $F_v$  ( $F_v(315)$ ) und die Phenylalanin-Mutante ( $F_v(Y34F_L)$ ) binden DNP-L-Lysin mit ähnlicher Affinität bei pH 6.8 ( $K_D = 250 \pm 20$  nM), während die Histidin-Mutante ( $F_v(Y34H_L)$ ) DNP-Lysin sechsmal weniger stark bindet ( $K_D = 1400 \pm 200$  nM). Das histidinmutierte  $F_v$ -Fragment beschleunigte die Hydrolyse ( $k_{cat}/K_m/k_{4-Melm}$ ) des Esters **8b** um einen Faktor von  $6.0 \pm 3.0 \times 10^5$  bezüglich der Reaktion mit 4-Methylimidazol bei pH 6.8. Die Anfangsgeschwindigkeit der Esterspaltung ist 50mal höher als diejenige des Wildtyp- $F_v$  oder der  $F_v(Y34F_L)$ -Mutante. Des Weiteren wird die Spaltung der homologen Ester **8a** und **8c** nicht wesentlich beschleunigt, was im Einklang mit dem postulierten Ort der Histidin-34-Seitenkette im aktiven Zentrum ist.

Die ortsspezifische Mutagenese dürfte ein wirkungsvolles Werkzeug sein, um sowohl die Effizienz anderweitig hergestellter, katalytisch aktiver Antikörper zu erhöhen als auch die katalytische Aktivität vorgegebener Antikörper schrittweise weiterzuentwickeln. Zusätzlich könnten auch genetische Selektion oder Screening-Verfahren zur Auswahl von katalytisch wirksamen Resten in der Bindungsstelle eines Antikörpers herangezogen werden, der bereits substratspezifisch (oder spezifisch für ein Analogon des Übergangszustands) ist.

### 3.2. Erzeugung von Antikörpern gegen Analoga von Übergangszuständen

Ein Antikörper gegen ein Hapten, das dem Übergangszustand einer gegebenen Reaktion ähnelt, sollte den Übergangszustand stabilisieren und dadurch die Aktivierungsenergie der Reaktion relativ zu Substraten und Produkten herabsetzen<sup>[40]</sup>. In der Tat sind die aktiven Zentren von vielen Enzymen in Struktur und Elektronenverteilung komplementär zum geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustand. Dies konnte sowohl durch Studien an aktiven Zentren

von Enzymen<sup>[41]</sup> als auch durch Inhibitionsstudien mit Analoga von Übergangszuständen<sup>[42]</sup> gezeigt werden. Antikörper gegen solche Analoga können die verschiedensten Reaktionen katalysieren (siehe Abschnitt 3.2.1 bis 3.2.3); dazu gehören Carbonat-, Ester- und Amidhydrolysen, die Claisen-Umlagerung von Chorisminsäure zu Prephensäure, bimolekulare Amidbildungsreaktionen, Bildung eines sechsgliedrigen Lactons und Bildung der Peptidbindung.

#### 3.2.1. Carbonat-, Ester- und Amidhydrolyse

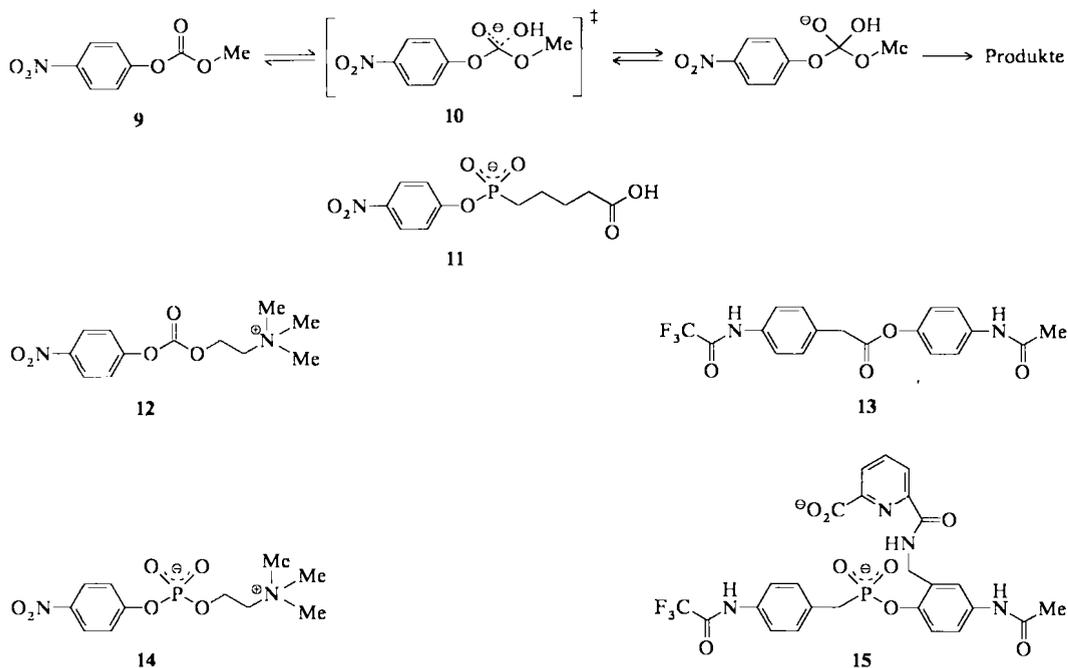
Die ersten katalytisch aktiven Antikörper, die spezifisch gegen Analoga von Übergangszuständen erhalten wurden, binden tetraedrische Phosphate und Phosphonate; es handelt sich dabei um Analoga des Übergangszustands der Hydrolyse von Carbonaten und Carbonsäureestern<sup>[43, 44]</sup>. Beim Entwurf dieser ersten Generation von katalytisch aktiven Antikörpern wurden mehrere Faktoren berücksichtigt. Carbonate und Carbonsäureester erfahren drastische strukturelle und elektronische Änderungen auf ihrem Reaktionsweg vom Substrat zum Produkt. Dies ermöglichte ein spezifisches Binden und Stabilisieren des Übergangszustandes. Darüber hinaus konnten die tetraedrischen Übergangszustände dieser Hydrolysereaktionen erfolgreich mit Phosphonat-,  $\alpha, \alpha$ -Difluoracyl- und Hydroxymethylgruppen imitiert werden. Hydrolysereaktionen verlangen nicht unbedingt katalytisch aktive Seitenketten (zum Beispiel eine nucleophile Serin-Seitenkette); ein einfacher Angriff eines in das aktive Zentrum eindringenden Wassermoleküls an der polarisierten Carbonylgruppe des Substrates genügt. Wünschenswert wären im weiteren gemeinsame strukturelle Erkennungsmerkmale sowohl im Substrat als auch im Übergangszustand sowie eine geringere Affinität des Antikörpers zu den Reaktionsprodukten als zu den Substraten.

Monoklonale Antikörper, welche spezifisch gegen die tetraedrischen Analoga **11**, **14** und **15** von Übergangszuständen gerichtet sind, katalysieren die Hydrolyse der entsprechenden Substrate **9** (Übergangszustand **10**), **12** bzw. **13** gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung [Gl. (1)]<sup>[43, 44]</sup>. Die antikörperkatalysierten Reaktionen wurden durch die Analoga der Übergangszustände kompetitiv inhibiert. Die Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) waren in jedem Falle deutlich kleiner als die entsprechenden  $K_m$ -Werte der Substrate, woraus geschlossen werden kann, daß die Stabilisierung des Übergangszustands einen Beitrag zur Katalyse leistet. Beim Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der antikörperkatalysierten Reaktionen [Gl. (2)] mit denjenigen der hydroxidabhängigen Hydrolysen [Gl. (3)] ergaben sich Geschwindigkeitserhöhungen um Faktoren von  $10^3$  bis  $10^5$ <sup>[43]</sup>.

$$v_{18} = k_{18} [I_g \cdot S][OH] \quad (2)$$

$$v_{OH} = k_{OH} [S][OH] \quad (3)$$

Diese Beschleunigungen bewegen sich in einem für die Stabilisierung des Übergangszustands in hydrolytischen Enzymen theoretisch erwarteten und auch experimentell bestätigten Bereich. So wird zum Beispiel ein *p*-Nitroanilinopeptid in Gegenwart einer Dreifachmutante des Enzyms Subtilisin, in welcher jede Aminosäure der katalytischen Triade His, Ser und Asp durch Alanin ersetzt wurde, 3000mal schneller als ohne diesen Katalysator hydrolysiert. Daraus läßt sich etwa die Größenordnung der Katalyse abschätzen, welche durch die Stabilisierung des Übergangszustands mit anderen Bin-



dungsdeterminanten als der katalytischen Triade zustandekommt<sup>[45]</sup>. In allen Fällen erwiesen sich die Antikörper auch als äußerst substratspezifisch.

Die dreidimensionale Struktur des Antikörpers McPC603, der in hohem Maße homolog zu den phosphorylcholinbindenden Antikörpern T15 und MOPC167 ist, konnte ermittelt werden. Die Röntgenstrukturanalyse ermöglicht es, die Aminosäurereste, die an der Katalyse beteiligt sind, in der Bindungstasche direkt zu erkennen (Abb. 5)<sup>[9]</sup>. Das Hapten wird in der Kavität von McPC603 so gebunden, daß die Cholingruppe tief im Inneren verborgen ist und die Phosphatgruppe an der Oberfläche Kontakt mit dem wäßrigen Lösungsmittel hat. Die Reste Tyr 33H und Arg 52H aus der schweren Kette, die in allen bis heute sequenzierten phosphorylcholinbindenden Immunglobulinen invariant auftreten<sup>[46]</sup>, binden die Phosphatgruppe an den Sauerstoffatomen über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen. Die Bindungsstelle von McPC603 ist sowohl sterisch als auch elektronisch komplementär zum tetraedrischen, negativ geladenen Phosphatrest des Phosphorylcholins. Da nun tetraedrisches Phosphat dieser Art den Übergangszustand der hydroxidkatalysierten Hydrolyse des

Carbonats **12** imitiert, ist zu erwarten, daß diese Antiphosphoryl-Antikörper die Carbonatgruppe von **12** so zu polarisieren vermögen, daß ein Angriff eines Hydroxid-Ions im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt begünstigt wird. Angesichts des Befundes, daß die Struktur von **12** im Grundzustand beträchtlich von derjenigen im Übergangszustand abweicht (vgl. **10**), sollten sich die verschiedenen starken Bindungsaffinitäten des Antikörpers zu diesen beiden Spezies in einer verminderten Aktivierungsenergie für die betrachtete Reaktion äußern. Tatsächlich beobachtet man, daß das Übergangszustandsanalogon 4-Nitrophenylphosphorylcholin **14** durch die Immunglobuline MOPC167 und T15 stärker gebunden wird als das entsprechende Substrat<sup>[46]</sup> ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ,  $K_m = 208 \mu\text{M}$  für MOPC167). Trotzdem läßt sich die Größenordnung der Geschwindigkeitserhöhung durch T15 und MOPC167 nicht vollständig mit den differenzierten Bindungseigenschaften des Analogons **14** und des Carbonats **12** erklären. Es ist also anzunehmen, daß im Falle von T15 und MOPC167 außer der durch Röntgenkristallographie und Affinitätsstudien belegten spezifischen Stabilisierung des Übergangszustandes noch andere Faktoren zur Herabsetzung der Aktivierungsenergie und somit zur Reaktionsbeschleunigung beitragen. Gegenwärtig werden Experimente zur ortsspezifischen Mutagenese ausgeführt, um die Rollen der verschiedenen Aminosäure-Seitenketten im aktiven Zentrum der phosphorylcholin-spezifischen Antikörper bei der Katalyse aufzudecken. Biophysikalische Studien und Experimente zur chemischen Modifikation deuten darauf hin, daß Tyrosin und Arginin in den für das Hapten **11** spezifischen Antikörpern katalytisch wirksam sind<sup>[43]</sup>. Diese Reste können wiederum den tetraedrischen Übergangszustand stabilisieren. Bei Antikörpern, welche spezifisch für das Hapten **15** sind, wird vermutet, daß Histidin oder Tyrosin an der Katalyse teilnehmen. Es ist jedoch unbekannt, welche Rolle sie dabei spielen.

Durch Immunisierung gegen Phosphonat-Analoga von Übergangszuständen konnten auch Antikörper gewonnen werden, welche die stereospezifische Hydrolyse von nicht aktivierten Alkylestern unter milden Bedingungen katalysieren<sup>[43f]</sup>. Diese Antikörper wurden gegen das Hapten **16** er-

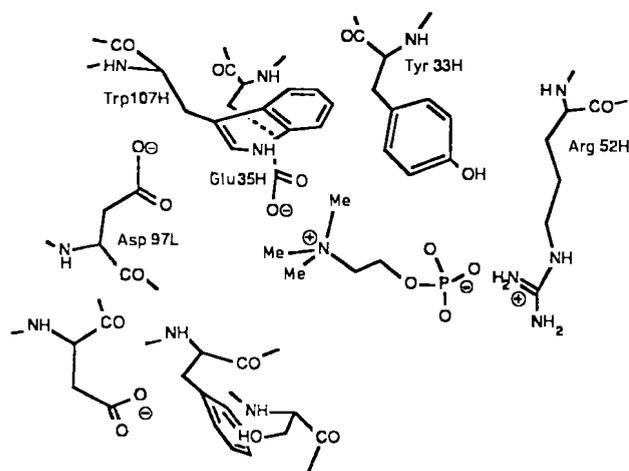
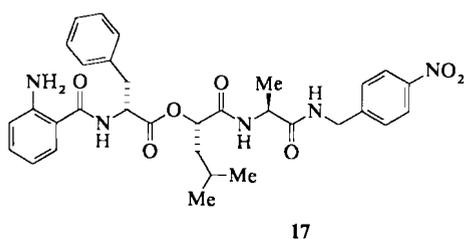
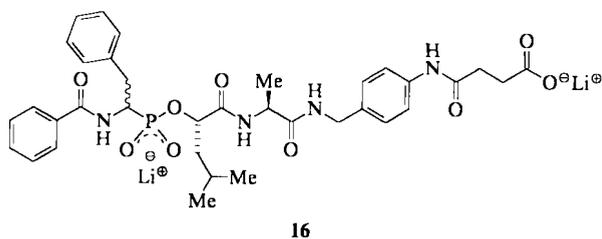


Abb. 5. Phosphorylcholin im Bindungszentrum des Antikörpers McPC603.

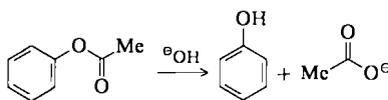
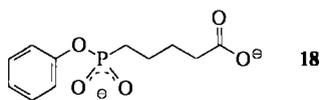
zeugt, ein Phosphonat-Analogon des Übergangszustands der basischen Hydrolyse des Esters **17**. Sowohl **16** als auch **17** sind Peptide. Es ist anzumerken, daß das Hapten **16** Analoga der fluorogenen Gruppen am *N*- und *C*-Terminus des Substrats **17** enthält. Diese Gruppen ermöglichen es, den Hydrolyseverlauf anhand des Fluoreszenzanstiegs zu verfolgen, welcher auftritt, wenn die fluoreszierende 2-Aminobenzoylgruppe und die fluoreszenzlöschende 4-Nitrobenzylcarbonylgruppe getrennt werden<sup>[47]</sup>. Diese empfindliche Analyseverfahren erlaubt ein direktes Screening an ELISA-Platten auf katalytische Aktivität, was die Produktion katalytisch aktiver Antikörper vereinfacht.



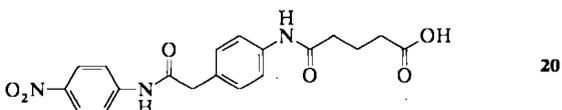
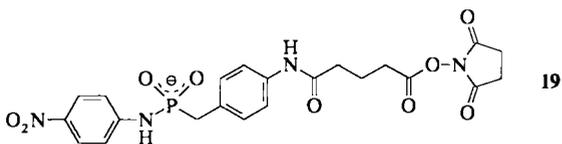
Interessanterweise katalysieren alle 18 aktiven Antikörper (von 25 insgesamt) die Hydrolyse des *D*-Phenylalanin enthaltenden Diastereomergemisch zur Erzeugung der Antikörper verwendet wurde<sup>[48]</sup>. Die Reaktion mit den Antikörpern verlief 50- bis 300mal schneller als mit Hydroxid-Ionen. Bei relativ großen Übergangszustandsanaloga wie etwa dem Tripeptid **16** ist es möglich, daß das tetraedrische Phosphonat proportional weniger zur Gesamtbindungsenergie des Hapten-Antikörper-Komplexes beisteuert als es in kleineren Analoga der Fall ist. Demzufolge wäre eine kleinere Geschwindigkeitszunahme zu erwarten als bei Antikörpern, welche gegen kleinere Übergangszustandsanaloga gerichtet sind. Die antikörperkatalysierte Reaktion war in hohem Maße spezifisch für den *D*-Phenylalanin enthaltenden Ester **17**. Bei drei von fünf Immunglobulinen war das Geschwindigkeitsverhältnis von *L*-Phe- versus *D*-Phe-Hydrolyse kleiner als 0.5%. Die Antikörper zeigten auch eine hohe Substratspezifität. Die Hydrolyse von Estern, die Nitrophenylalanin, Leucin oder Tryptophan anstelle von Phenylalanin enthielten, wurde von keinem der Antikörper katalysiert. Solche Antikörper könnten sich zur Enantiomerentrennung von racemischen Aminosäuren und Alkoholen eignen<sup>[49, 74]</sup>.

Mit Antikörpern lassen sich auch Reaktionen an wasserunlöslichen organischen Substraten katalysieren. Immunglobuline, die spezifisch gegen das Analogon **18** gezüchtet wurden, können die Hydrolyse von Essigsäurephenylester in inversen Micellen beschleunigen<sup>[50]</sup>. Die  $k_{cat}$ - und  $K_m$ -Werte des in inversen Micellen in Isooctan solubilisierten Antikörpers betragen  $3.74 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $650 \mu\text{M}$  [Wo-Wert (Wasser: Detergens) von 23] und in wäßriger Lösung  $18.8 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $157 \mu\text{M}$ . Der optimale Wo-Wert ist deutlich höher als bei

Enzymen, was in Einklang mit dem höheren Molekulargewicht der Immunglobuline ist. Die Fähigkeit von katalytisch aktiven Antikörpern, auch in inversen Micellen zu wirken, dürfte den Wert dieser Spezies für Katalyse und Immunoassays erhöhen.



Kürzlich wurden Antikörper gegen das KLH-Konjugat des Arylphosphonamids **19** erhalten. Ein Antikörper katalysierte die Hydrolyse des Nitroanilins **20**<sup>[51]</sup> mit  $k_{cat} = 0.08 \text{ min}^{-1}$  und  $K_m = 562 \mu\text{M}$ . Die antikörperkatalysierte Reaktion ist durch hohe Spezifität und eine Geschwindigkeitserhöhung um einen Faktor von  $2.5 \times 10^5$  gegenüber der unkatalysierten Reaktion gekennzeichnet. Die Energiedifferenz zwischen der Komplexierung des Phosphonamids **19** als Übergangszustandsanalogon ( $K_i$ ) und des Substrats ( $K_m$ ) [ $\Delta\Delta G^\ddagger = -2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ] erklärt die Größenordnung der Geschwindigkeitszunahme nicht vollständig. Demnach müssen auch noch andere Faktoren, zum Beispiel Säure- oder Basenkatalyse oder Destabilisierung des Grundzustands, einen Beitrag zur Katalyse leisten. Daß sich eine Bindungsstelle mit diesen zusätzlichen katalytischen Eigenschaften gebildet hat, könnte ganz einfach das Produkt der immunologischen Vielfalt (ein Immunglobulin von 44 war katalytisch aktiv) oder aber eine Folge der Struktur des Haptens selbst gewesen sein. Im Hapten haben sowohl die

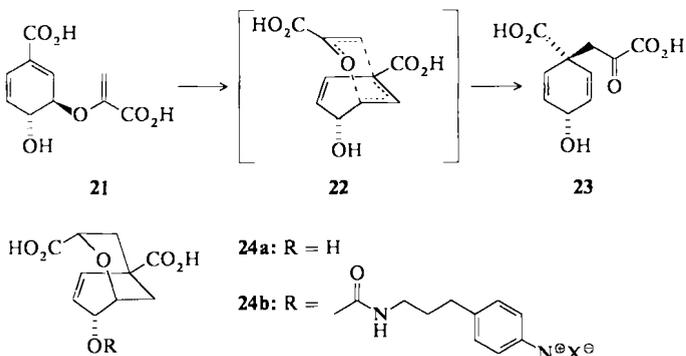


P-NH- als auch die P-O-Gruppe mindestens je ein freies Elektronenpaar, das als Wasserstoffbrückenacceptor dienen kann, aber nur die P-NH-Gruppe kann auch als Wasserstoffbrückendonator wirken. Es ist vorläufig noch unklar, wie solche Unterschiede im Wasserstoffbrückenmuster sich auf die Natur der Bindungsstelle auswirken. Eine mechanistische Analyse dieser antikörperkatalysierten Reaktion könnte wichtige Impulse zur Herstellung von Immunglobulinen liefern, welche die verwandte, jedoch bedeutend mehr Energie erfordernde Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Es sind außerdem auch Analoga für den Übergangszustand der Hydrolyse von Glycosidbindungen (Nojirimycin-derivate) und Phosphodiesterbindungen (Nucleosid-Vanadyl-Komplexe) denkbar.

### 3.2.2. Eine Claisen-Umlagerung

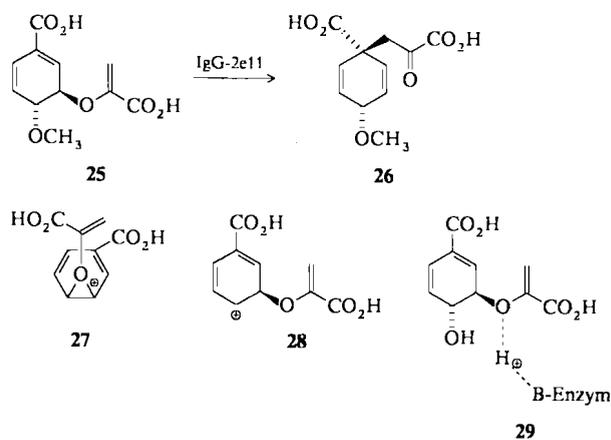
Es ist auch durchaus vorstellbar, Antikörper zu erzeugen, deren katalytische Aktivität durch das Herabsetzen der entropischen Barrieren von Reaktionen zustande kommt. Die Bindungsenergie wird in diesem Fall ausgenutzt, um die Translation und Rotation der Reaktanten durch korrekte Anordnung der reagierenden Gruppen in der Bindungsstelle des Antikörpers zu verringern. Diese Methode sollte sowohl auf intramolekulare (zum Beispiel Bildung makrocyclischer Lactone) als auch auf intermolekulare Reaktionen (zum Beispiel Diels-Alder-Reaktionen und Bildung von Peptiden) anwendbar sein.

Von diesen Vorstellungen geleitet haben wir Antikörper hergestellt, welche die formale Claisen-Reaktion von Chorisminsäure **21** zu Prephensäure **23**<sup>[52]</sup> katalysieren. Diese thermische 3,3-sigmatrope Umlagerung verläuft über einen asymmetrischen, sesselförmigen Übergangszustand **22**, in welchem die C-O-Bindung bereits vor dem Beginn der C-C-Bindungsbildung zum größten Teil gebrochen ist<sup>[53]</sup>. Für diese Reaktion wurde eine Aktivierungsentropie von  $-12.85 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  und eine Aktivierungsenthalpie von  $20.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  ermittelt<sup>[53]</sup>. Die unimolekulare Umlagerung wird durch das Enzym Chorismat-Mutase um einen Faktor von ungefähr  $10^6$  beschleunigt. Das Enzym ist an der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in Bakterien und Pflanzen beteiligt<sup>[54]</sup>. Es wurde gezeigt, daß die enzymkatalysierte Reaktion über einen sesselförmigen Übergangszustand verläuft, doch weiß man sonst wenig über den Katalysemechanismus<sup>[55]</sup>.



Man würde erwarten, daß die Bindungsstelle eines Antikörpers, welche komplementär zur konformationell fixierten Struktur des Übergangszustandes ist, vermutlich aber über keine katalytisch aktiven Aminosäure-Seitenketten verfügt, die Claisen-Reaktion von Chorismin- zu Prephensäure katalysiert. Deshalb wurden monoklonale Antikörper gegen das bicyclische Analogon **24a** des Übergangszustands **22** erzeugt; **24a** ist der potenteste bisher bekannte Inhibitor der Chorismat-Mutase mit einem  $K_i$ -Wert von  $0.15 \mu\text{M}$ <sup>[56]</sup>. Einer von acht Antikörpern (IgG) gegen das KLH-Konjugat von **24b** katalysierte die Claisen-Umlagerung **21**  $\rightarrow$  **23** mit Anfangsgeschwindigkeiten, die mit der Michaelis-Menten-Gleichung [Gl. (1)] kompatibel sind ( $k_{\text{cat}} = 2.7 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m = 260 \mu\text{M}$  bei  $10^\circ\text{C}$ ). Die Geschwindigkeit der antikörperkatalysierten Reaktion konnte direkt mit derjenigen der unkatalysierten, thermischen Umlagerung verglichen werden; dabei ergab sich, daß die katalysierte Reaktion  $10^4$ mal schneller verläuft (bei  $10^\circ\text{C}$  und pH 7.0). Diesem Faktor sei die

$3 \times 10^6$ fache Beschleunigung gegenübergestellt, welche mit Chorismat-Mutase aus *E. coli* unter denselben Bedingungen erzielt wurde. Von den Mechanismen, die für die enzymkatalysierte Umlagerung vorgeschlagen wurden, können die meisten für die antikörperkatalysierte Reaktion ausgeschlossen werden. Zum Beispiel spricht die Tatsache, daß der ( $\pm$ )-Methylether **25** von Chorisminsäure zum ( $\pm$ )-Methylether **26** von Prephensäure umgewandelt wird, gegen den Mechanismus, in welchem die 4-Hydroxygruppe z. B. unter Bildung von **27** oder eines C-4-Kations wie **28** verloren geht. Überdies schließt die Abwesenheit eines Isotopeneffektes beim



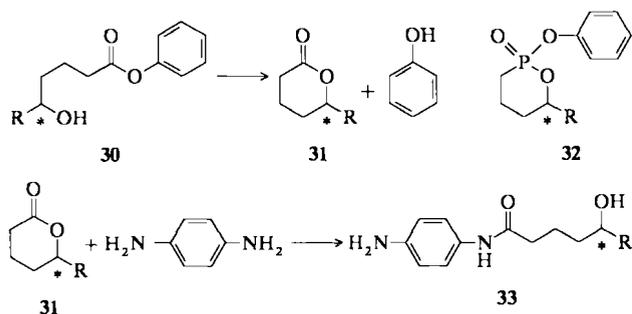
Arbeiten in  $\text{D}_2\text{O}$  generelle Säure- oder Basenkatalyse (vgl. **29**) im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt aus. So bleibt die mechanistisch ansprechende Variante übrig, wonach der Antikörper die Reaktion katalysiert, indem er eine zum konformationell fixierten Übergangszustand komplementäre Umgebung schafft. Dafür sprechen die Werte von  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$ , die für die antikörperkatalysierte Reaktion  $18.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  bzw.  $-1.2 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  betragen<sup>[57]</sup>.

Unabhängig von unseren Arbeiten wurde ein weiterer Antikörper gegen ein estergebundenes Analogon von **24a** erzeugt. Dieses Immunoglobulin konnte ebenfalls die Umlagerung von Chorismin- zu Prephensäure katalysieren, jedoch 100mal langsamer<sup>[58]</sup> als unser Antikörper. Hier stimmte aber das Verhältnis  $K_i/K_m$  mit der beobachteten Geschwindigkeitserhöhung ungefähr überein und war somit im Einklang mit der bevorzugten Komplexierung des Übergangszustandsanalogons durch den Antikörper. Die Stabilisierung war größtenteils enthalpischer Natur. Außerdem handelte es sich dabei um einen hoch stereospezifischen Antikörperkatalysator, der ausschließlich das ( $-$ )-Isomer der Chorisminsäure als Substrat akzeptierte<sup>[58]</sup>.

### 3.2.3. Transacylierungsreaktionen

Die Beschränkungen, die eine Antikörper-Bindungstasche ihrem Substrat aufzwingt, sollten ausreichen, um eine intramolekulare Cyclisierungsreaktion durch Verringerung der Rotationsentropie zu beschleunigen<sup>[59]</sup>. Benkovic et al. zeigten, daß ein Antikörper gegen das Übergangszustandsanalogon **32** die Bildung des Lactons **31** aus dem Substrat **30** katalysiert. Das Geschwindigkeitsverhältnis der katalysierten zur unkatalysierten Reaktion betrug 167:1. Wiederum ließ sich die antikörperkatalysierte Reaktion mit dem ent-

sprechenden cyclischen Phosphonat kompetitiv inhibieren. Die Ringschlußreaktion war außerdem enantioselektiv und ermöglichte die Isolierung des Lactons **31** mit einem Enantiomerenüberschuß von 94%<sup>[60]</sup>. Die gegen **32** erzeugten Antikörper katalysierten auch die stereoselektive Bildung des Amids **33** aus dem racemischen Lacton **31** und 1,4-Diaminobenzol<sup>[61]</sup>. Der Antikörper bindet 1,4-Diaminobenzol



und das Lacton **31** mit  $K_m$ -Werten von 1.2 mM bzw. 4.9 mM; für die Bindung des Übergangszustandsanalogons **32** wurde  $K_i = 75$  nM bestimmt. Die Geschwindigkeitserhöhung der antikörperkatalysierten relativ zur unkatalysierten Reaktion betrug 16 M; zum Vergleich:  $K_m \cdot K_m / K_i = 155$  M. An einem zweiten Phosphonamidat-spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, daß er eine bimolekulare Amidbildung mit einer effektiven Molarität von 10.5 M katalysiert (in diesem Fall war die Abgangsgruppe *nicht* Teil des Haptens)<sup>[62]</sup>. Diese Werte sind um Größenordnungen kleiner als der Wert  $10^8$  M, der als hypothetischer oberer Grenzwert einer antikörperkatalysierten Reaktion relativ zur unkatalysierten bimolekularen Variante angesehen wird<sup>[63]</sup>. Nichtsdestoweniger legt die Demonstration einer antikörperkatalysierten, bimolekularen Reaktion nahe, daß sich Peptidbildungs-, Diels-Alder- und Transglycosylierungsreaktionen sowie Makrolidsynthesen auf analoge Weise katalysieren lassen<sup>[75]</sup>.

### 3.3. Einführung von synthetischen Katalysatoren in Bindungsstellen von Antikörpern

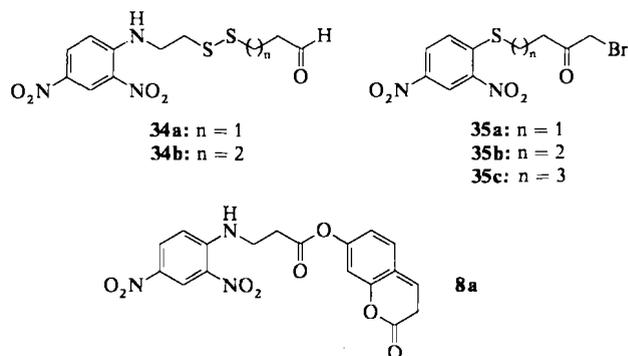
#### 3.3.1. Semisynthetische Antikörper

Katalytisch aktive Gruppen, zum Beispiel Übergangsmetallkomplexe, Cofaktoren, Basen oder Nucleophile, könnten auch durch selektive chemische Modifikation in die Bindungsstelle von Antikörpern eingebracht werden. Kaiser et al. zeigten, daß Enzyme selektiv mit Cofaktoren modifiziert werden können und dabei semisynthetische Enzyme mit neuen Eigenschaften bilden<sup>[64]</sup>. Diese Methode konnte kürzlich auch auf Antikörper übertragen werden, was zu einer Kombination der exquisiten Bindungsspezifitäten des Immunsystems mit den verschiedensten hocheffizienten Katalysatoren der synthetischen Chemie führte<sup>[65, 66]</sup>.

Der Schlüssel zum Erfolg bei der Herstellung von semisynthetischen, katalytisch aktiven Antikörpern liegt in der Entwicklung von milden Methoden zur selektiven Einführung von derivatisierbaren funktionellen Gruppen mit einzigartiger Reaktivität in die Bindungsstelle oder ihre engere Umgebung. Diese Gruppen können nun in einem zweiten Schritt mit anderen funktionellen Einheiten wie Cofaktoren, Metall-Ligand-Komplexen, Fluorophoren etc. beladen werden.

Eine solche Gruppe ist die derivatisierbare freie Thiofunktion, welche selektiv via Disulfidaustausch oder elektrophile Reaktionen modifiziert werden kann, weil sie stark nucleophil ist und sich leicht oxidieren läßt. Außerdem könnte die Einführung einer nucleophilen Thiolgruppe in die Bindungsstelle direkt zu einem katalytisch aktiven Antikörper führen. Wir haben spaltbare Affinitätsmarker verwendet, um selektiv die Bindungstasche des Immunglobulins (IgA) MOPC315 mit einer solchen Thiolgruppe auszurüsten<sup>[65]</sup>. Diese Methode erfordert keinerlei Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Immunglobulins und sollte deshalb auf eine große Anzahl solcher Proteine anwendbar sein.

Es wurden Reagentien zur Affinitätsmarkierung synthetisiert, in denen die DNP-Gruppe über eine spaltbare Disulfid- oder Sulfidfunktion mit einem elektrophilen Aldehyd oder einem  $\alpha$ -Bromketon verknüpft ist (vgl. **34** bzw. **35**). Da die



Position einer nucleophilen Lys-, His- oder Tyr-Seitenkette in der Bindungsstelle des Antikörpers nicht genau bekannt war, variierte man bei den Affinitätsmarkern die Distanz zwischen der DNP-Gruppe und dem elektrophilen Rest. Die kovalente Verknüpfung des Markers mit dem Immunglobulin, gefolgt von der Abspaltung und anschließenden Entfernung des DNP-Liganden, ergab einen Antikörper vom Typ **36a** mit einer gezielt eingeführten freien Thiolgruppe (Abb. 6). Im Falle der Derivatisierung mit dem Aldehyd **34b**

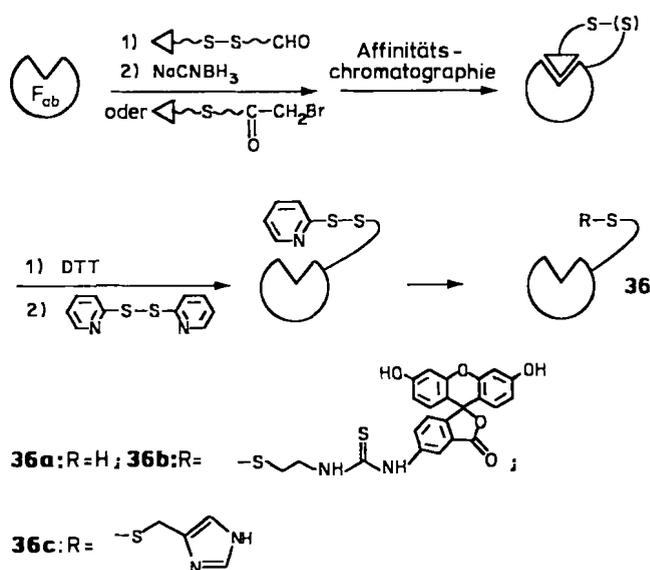


Abb. 6. Prinzip der Einführung von synthetischen Katalysatoren in die Bindungsstellen von Antikörpern. DTT = Dithiothreitol.

in Gegenwart von  $\text{NaCNBH}_3$  erhielt man nach Spaltung der Disulfidbrücke einen homogenen Antikörper, dessen freie Thiolgruppe an Lys 52H<sup>[65]</sup> geknüpft war (das Bromketon **35b** führte zu einem einheitlichen, an Tyr 34L modifizierten Antikörper). Die Bindungsaffinität dieses Antikörpers, der an Lys 52H thiolmodifiziert war, an *N*-DNP-Glycin ähnelte derjenigen an unverändertem MOPC315. Die Thiolgruppe selbst ist so positioniert, daß sie bei der Thiolyse des Cumarinesters **8a** als Nucleophil wirken kann<sup>[65]</sup>. Der semisynthetische Antikörper wies Sättigungskinetik auf und konnte mit DNP-Glycin kompetitiv inhibiert werden ( $K_i = 8 \mu\text{M}$ ). Die Hydrolyse von **8a** verlief in Gegenwart des Thiolantikörpers  $6 \times 10^4$ mal schneller als in Gegenwart von Dithiothreitol. Dieser Wert ist demjenigen der antikörperkatalysierten  $\beta$ -Eliminierungsreaktion recht ähnlich und zeigt, daß die Nähe einer Base oder eines Nucleophils zum komplexierten Substrat den  $\Delta G^\ddagger$ -Wert der Reaktion um bis zu  $7 \text{ kcal mol}^{-1}$  senken kann.

Eine solche Thiolgruppe ließ sich auch als Anker benutzen, um andere chemische Gruppen in die Bindungsstelle einzubringen<sup>[65, 66]</sup>. So konnte Imidazol durch Reaktion des Pyridyldisulfid-Adduktes des Antikörpers mit 4-(Mercapto-methyl)imidazol in mehr als 90% Ausbeute eingebaut werden<sup>[66]</sup> (Abb. 6). Der so erhaltene semisynthetische Antikörper vom Typ **36c** hydrolysierte den Cumarinester **8a** 1000mal schneller als 4-Methylimidazol selbst. Wahrscheinlich wirkt Imidazol bei der Hydrolyse von **8a** als generelle Base oder als Nucleophil. Daß die Hydrolyse in Gegenwart dieses Antikörpers nicht schneller verläuft, könnte mit der erhöhten Flexibilität der Imidazolseitenkette erklärt werden. Der semisynthetische Antikörper hydrolysierte spezifisch den 3-(DNP-Amino)propionsäureester **8a** und diskriminierte die homologen *N*-DNP-Glycin- und 4-(DNP-Amino)buttersäureester.

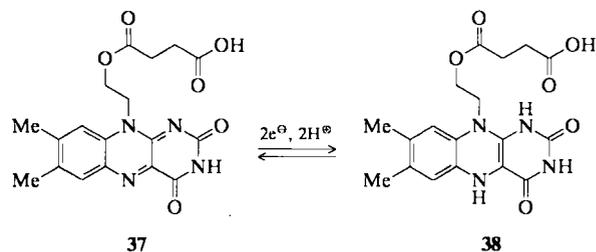
Es ist interessant, die Katalyse durch  $F_v(\text{Y34H}_L)$  (siehe Abschnitt 3.1.2) mit derjenigen durch modifiziertes MOPC315 zu vergleichen, dessen Lysin 52H mit Imidazol über ein acht Bindungen langes „Distanzstück“ verbunden wurde<sup>[6]</sup>. Durch  $F_v(\text{Y34H}_L)$  wurde **8a** rund 16mal schneller als durch das imidazolderivatisierte  $F_{ab}$ -Fragment hydrolysiert. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die verringerte Flexibilität der Histidin-34-Seitenkette (aufgezwungen durch das Proteinrückgrat und die umgebenden Seitenketten) zurückzuführen. Außerdem könnte der Imidazolring für einen Angriff an der Carbonylfunktion oder für die Aktivierung eines Wassermoleküls besser orientiert sein.

Der thiolderivatisierte Antikörper **36a** konnte auch mit einem Fluorophor beladen werden<sup>[65]</sup>. Durch Zugabe des Liganden *N*-DNP-Glycin zum Addukt **36b** verminderte sich dessen Fluoreszenz, was direkt zur Messung der Komplexbildungsreaktion diente. Die Bindungskonstante, die durch die Auslöschung der Fluorescein-Fluoreszenz ermittelt wurde, stimmte innerhalb der experimentellen Fehlergrenze exakt mit dem publizierten Wert für das unmodifizierte Immunglobulin MOPC315 überein<sup>[34]</sup>. Semisynthetische Antikörper dieser Art könnten wertvolle Dienste als Sensoren oder Diagnostika leisten. Die Derivatisierung von Antikörpern mit anderen Gruppen ( $\text{Zn}^{2+}$ - oder  $\text{Co}^{3+}$ -Ligand-Komplexe, Flavine, Pyridoxamin etc.) dürfte zu semisynthetischen Antikörpern mit einer Vielfalt neuartiger katalytischer Eigenschaften führen. Auch therapeutisch wichtige Agentien lie-

ßen sich mit dieser Strategie in nächste Nähe zur Bindungsstelle bringen.

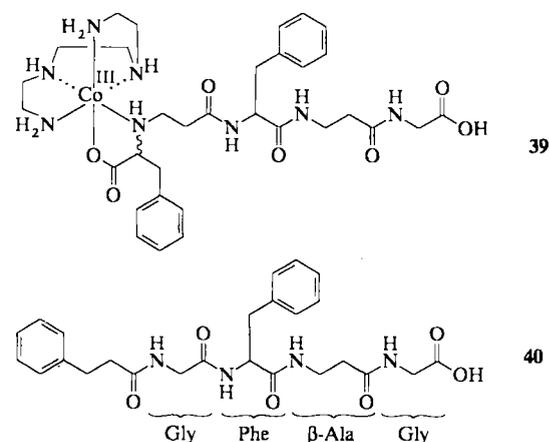
### 3.3.2. Bindungsstellen für Cofaktoren

Bei einer weiteren Möglichkeit zum Einbringen katalytisch aktiver Gruppen in die Bindungsstelle von Antikörpern muß zusätzlich zur Substrat-Bindungsstelle eine Bindungsstelle für natürliche oder synthetische Cofaktoren bereitgestellt werden<sup>[67]</sup>. In diesem Sinne wurden zunächst Antikörper gegen das Flavin **37** erzeugt. Das Flavin **37** und das



1,5-Dihydroflavin **38** haben grundsätzlich verschiedene elektronische und geometrische Eigenschaften<sup>[68]</sup>. Ein Antikörper gegen **37** bindet dieses Flavin  $4 \times 10^4$ mal stärker als das 1,5-Dihydroflavin **38**. Diese unterschiedliche Stabilisierung der oxidierten und der reduzierten Form des Cofaktors in der Bindungsstelle des Antikörpers machte den  $\text{Ig} \cdot \text{38}$ -Komplex zu einem bedeutend stärkeren Reduktionsmittel als freies Dihydroflavin in Lösung. Das Reduktionspotential des Komplexes beträgt  $-342 \text{ mV}$ , das des freien Flavins ( $E_m$ )  $-206 \text{ mV}$ ; somit unterscheiden sich die Reduktionspotentiale um ca.  $5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Diese Eigenschaften bewirken, daß das Substrat Safranin T ( $E_m = -289 \text{ mV}$ ) vom Antikörper-**38**-Komplex schnell reduziert wird, während freies **38** unter denselben Bedingungen inaktiv ist. Dieser Antikörper-Flavin-Komplex kann somit Redoxprozesse ausführen, welche für das freie Flavin thermodynamisch nicht erreichbar sind. Würde man zusätzlich eine Substratbindungsstelle in solche Antikörper einbauen, so dürfte dies zu katalytisch aktiven Antikörpern führen, welche stereoselektive chemische Reduktionen ausführen könnten.

Ein hervorragendes Resultat auf dem Gebiet der katalytisch wirksamen Antikörper ist die kürzlich gelungene Synthese eines Immunglobulins, welches einen Metallkomplex-Cofaktor bindet und die spezifische Hydrolyse der Gly-Phe-Bindung des Peptidsubstrats **40** bei neutralem pH katalysiert<sup>[69]</sup>. Die Antikörper wurden durch Immunisie-



rung mit dem Hapten **39** hergestellt, einem Co<sup>III</sup>-Peptid-Komplex mit dem Liganden Triethylentetramin („Trien“). Antikörper dieser Art können nicht nur den Trien-Komplex von Co<sup>III</sup>, sondern auch Trien-Komplexe vieler weiterer Metalle binden. Der Antikörper-Trien-Metallkomplex spaltete selektiv die Gly-Phe-Bindung des Peptides **40**. Einer dieser Antikörper wurde im Detail untersucht; mit den Antikörper-Trien-Komplexen von Zn<sup>II</sup>, Ga<sup>III</sup>, Fe<sup>III</sup>, In<sup>III</sup>, Cu<sup>II</sup>, Ni<sup>II</sup>, Lu<sup>III</sup>, Mg<sup>II</sup> oder Mn<sup>II</sup> als Cofaktoren ließ sich das Peptid **40** spalten. Der Umsatzwert betrug  $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Interessanterweise ist die hydrolysierte Amidbindung um eine Einheit von der Bindung entfernt, die nach Modellstudien von Buckingham et al. gespalten werden sollte<sup>[70]</sup>. Nichtsdestoweniger markiert diese Arbeit den Startpunkt für die Herstellung von sequenzspezifischen Peptidasen, dem Restriktionsenzym-Äquivalent für Proteine.

Die Erzeugung von Bindungsstellen für natürliche und synthetische Cofaktoren in Antikörpern dürfte ein allgemeingültiger, wichtiger Weg zur Herstellung von neuen Antikörperkatalysatoren für Hydrolyse- und Redoxreaktionen sein. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß Stollar et al. schon vor Jahren die Erzeugung von Antikörpern versucht hatten, die Pyridoxamin binden und die Bildung von Schiff-Basen sowie Transaminierungen katalysieren sollten<sup>[71]</sup>. Der Mißerfolg dieser Arbeiten könnte auf die Verwendung von polyklonalen Antikörpern zurückzuführen sein.

#### 4. Verwandte Anwendungen in der Organischen Chemie

Antikörper dürften sich in vielen Bereichen der Organischen Chemie anwenden lassen. Als Beispiel einer schon gelungenen Anwendung sei angeführt, daß Immunoglobuline kürzlich als Template zur Kontrolle des stereochemischen Verlaufes von Photoadditionsreaktionen eingesetzt wurden<sup>[72]</sup>. Antikörper, die komplementär zu cyclischen Peptiden sind, könnten bei der gezielten Entwicklung von Arzneimitteln helfen, denn mit ihnen sollte sich der Einfluß konformationeller Einschränkungen auf deren Bindung klären lassen. Zu kovalent miteinander verbundenen Elektronendonoren und Elektronenacceptoren komplementäre Antikörper könnten als Gerüst dienen, um Through-bond- und Through-space-Effekte auf die Elektronentransfergeschwindigkeit zu beobachten. Und Antikörper gegen Azoalkane könnten verwendet werden, um Umgebungseffekte auf Radikalreaktionen zu studieren. Die Herstellung maßgeschneiderter Mikroumgebungen in Form monoklonaler Antikörper eröffnet dem Organiker mit Sicherheit neue, vielversprechende Möglichkeiten.

#### 5. Schluß

In der kurzen Zeitspanne seit den ersten Berichten über die Katalyse durch Antikörper im Jahre 1986<sup>[43, 44]</sup> konnte eine ganze Reihe von Reaktionstypen der Antikörperkatalyse zugänglich gemacht werden. Die Spezifitäten dieser Katalysatoren sind hoch, und es konnten Geschwindigkeitserhöhungen festgestellt werden, die sich denjenigen von Enzymen nähern. Für die Erzeugung katalytisch aktiver Antikörper

wurde eine Anzahl allgemeingültiger Strategien entwickelt. Die Herstellung von Antikörpern, welche fähig sind, Reaktionen um das 10<sup>8</sup>-fache oder noch stärker zu beschleunigen, verlangt eine sorgfältige mechanistische Analyse der Faktoren, die für die Katalyse maßgeblich sind; außerdem wird es unerlässlich sein, Immunoglobuline zu erzeugen, die *mehrere dieser Faktoren in sich vereinigen*. Dieser Prozeß wird nicht nur neue Einsichten in die Natur der molekularen Erkennung und der Katalyse selbst bringen, sondern dürfte auch zu maßgeschneiderten Katalysatoren für Anwendungen in Chemie, Biologie und Medizin führen.

*Der Autor dankt allen seinen Mitarbeitern, deren Namen in den Literaturzitate aufgeführt sind, für ihre wertvollen Beiträge; dem Office of Naval Research, der National Science Foundation, dem Department of Energy und den National Institutes of Health ist er für finanzielle Unterstützung ebenfalls zu Dank verpflichtet.*

Eingegangen am 26. Mai 1989 [A 737]

Übersetzt von Dr. Christian Leumann, Zürich (Schweiz)

- [1] a) G. Kohler, C. Milstein, *Nature (London)* 256 (1975) 495; b) F. R. Seiler, P. Gronski, R. Kurrle, G. Lüben, H.-P. Harthus, W. Ax, K. Bosslet, H.-G. Schwick, *Angew. Chem.* 97 (1985) 141; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 139; c) J. W. Goding: *Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, New York 1986.
- [2] a) R. C. Nowinski, M. R. Tam, L. C. Goldstein, L. Strong, C.-C. Kuo, L. Corey, W. E. Stamm, H. H. Handsfield, J. S. Knapp, K. K. Holms, *Science (Washington, D.C.)* 219 (1983) 637; b) E. S. Vitetta, K. A. Krulick, M. Miyama-Inaba, W. Cushley, J. W. Uhr, *ibid.* 219 (1983) 644.
- [3] a) D. Pressman, A. Grossberg: *The Structural Basis of Antibody Specificity*, Benjamin, New York 1968; b) J. W. Goodman in M. Sela (Hrsg.): *The Antigens, Vol. 3*, Academic Press, New York 1985; c) A. Nisonoff, J. Hopper, S. Spring: *The Antibody Molecule*, Academic Press, New York 1975.
- [4] a) K. Landsteiner: *The Specificity of Serological Reactions*, Harvard University Press, Cambridge 1944; b) F. Karush, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 5519; c) L. Pauling, D. Pressman, A. Grossberg, *ibid.* 66 (1944) 784.
- [5] A. Nisonoff, D. Pressman, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 1616.
- [6] a) A. L. Grossberg, D. Pressman, *Biochemistry* 7 (1968) 272; b) M. H. Freedman, A. L. Grossberg, D. Pressman, *ibid.* 7 (1968) 1941; c) D. Pressman, M. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 686.
- [7] a) R. Dwek, S. Wain-Hobson, S. Dower, P. Gettins, B. Sutton, S. J. Perkins, D. Givol, *Nature (London)* 266 (1977) 31; b) S. Dower, R. Dwek, *Biochemistry* 18 (1979) 3668.
- [8] a) A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. Phillips, R. J. Poljak, *Science (Washington, D.C.)* 233 (1986) 747; b) S. Sheriff, E. W. Silvertown, E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. J. Smith-Gill, B. C. Finzel, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 8075.
- [9] a) D. Segal, E. Padlan, G. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter, D. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4298; b) E. Padlan, G. Cohen, D. Davies, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 126 (1985) 271; c) E. Padlan, *Q. Rev. Biophys.* 10 (1977) 35; d) E. Padlan, *J. Mol. Biol.* 190 (1986) 593.
- [10] a) L. A. Day, J. M. Sturtevant, S. Singer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103 (1963) 611; b) A. Froese, A. H. Schon, M. Eigen, *Can. J. Chem.* 40 (1962) 1786; c) J. Pecht, D. Givol, M. Sela, *J. Mol. Biol.* 68 (1972) 241.
- [11] L. Amzel, R. Poljak, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 961.
- [12] S. Tonegawa, *Nature (London)* 302 (1983) 575.
- [13] L. Amzel, R. Poljak, F. Saul, J. Varga, F. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1427.
- [14] P. M. Colman, W. G. Laver, J. N. Varghese, A. T. Baker, P. A. Tulloch, G. M. Air, R. G. Webster, *Nature (London)* 326 (1987) 358.
- [15] M. Marquart, J. Deisenhofer, R. Huber, N. Palm, *J. Mol. Biol.* 141 (1980) 369.
- [16] E. Engvall, *Meth. Enzymol.* 70 (1980) 419.
- [17] a) B. Erlanger, *Meth. Enzymol.* 70 (1980) 85; b) T. Nishima, A. Tsuji, D. Fukushima, *Steroids* 24 (1974) 861.
- [18] B. Hurn, S. Chantler, *Meth. Enzymol.* 70 (1980) 104.
- [19] a) R. Sugasawara, C. Prato, J. Sippel, *Infect. Immun.* 42 (1983) 863; b) E. Engvall, J. Perlmann, *J. Immunol.* 109 (1972) 129.
- [20] G. Kronvall, H. Grey, R. Williams, *J. Immunol.* 109 (1972) 129.
- [21] K. M. Shokat, C. J. Leumann, R. Sugasawara, P. G. Schultz, *Nature (London)* 338 (1989) 269.
- [22] C. T. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, New York 1978.
- [23] a) D. W. Hilber, J. A. Gerlt, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 45 (1986) 1875; b) E. H. Serpersu, D. Shortle, A. S. Mildvan, *Biochemistry* 26 (1987) 1289.

- [24] C. S. Craik, S. Roczniak, C. Largman, W. J. Rutter, *Science (Washington, D.C.)* 237 (1988) 909.
- [25] A. G. Cochran, R. Sugasawara, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 7888.
- [26] a) C. Helene, M. Charlier, *Photochem. Photobiol.* 25 (1977) 429; b) J. R. Van Camp, T. Young, R. F. Hartman, S. D. Rose, *ibid.* 45 (1988) 365.
- [27] H. D. Roth, A. Lamola, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 1013.
- [28] a) S. E. Rotika, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4589; b) M. S. Jorns, *ibid.* 109 (1987) 3133.
- [29] M. S. Jorns, G. B. Sancar, A. Sancar, *Biochemistry* 24 (1985) 1856.
- [30] A. A. Lamola, *Mol. Photochem.* 4 (1972) 107.
- [31] a) F. Kohen, J. B. Kim, H. R. Lindner, Z. Eshbar, B. Green, *FEBS Lett.* 111 (1980) 427; b) F. Kohen, J. B. Kim, G. Barnard, H. R. Lindner, *Biochim. Biophys. Acta* 629 (1980) 328.
- [32] E. Baldwin, P. Schultz, unveröffentlicht.
- [33] D. Haselkorn, S. Friedman, D. Givol, I. Pecht, *Biochemistry* 13 (1974) 2210.
- [34] a) R. A. Dwek, S. Wain-Hobson, S. Dower, P. Gettins, B. Sutton, S. J. Perkins, *Nature (London)* 266 (1977) 31; b) S. K. Dower, R. A. Dwek, *Biochemistry* 18 (1979) 3668; c) K. Kumar, D. J. Phelps, P. R. Carey, N. M. Young, *Biochem. J.* 175 (1978) 727; d) D. A. Kooistra, J. H. Richards, *Biochemistry* 17 (1978) 345; e) E. J. Goetzl, H. Metzger, *ibid.* 9 (1970) 3862; f) D. Givol, *ibid.* 10 (1971) 3461; g) P. H. Strausbauch, Y. Weinstein, M. Wilchek, S. Shaltiel, D. Givol, *ibid.* 10 (1971) 4342.
- [35] J. Haimovich, H. N. Eisen, E. Hurwitz, D. Givol, *Biochemistry* 11 (1972) 2389.
- [36] R. Leatherbarrow, W. Jackson, R. Dwek, *Biochemistry* 21 (1982) 5124.
- [37] a) J. Hochman, D. Inbar, D. Givol, *Biochemistry* 12 (1973) 1130; b) J. Hochman, M. Gavish, D. Inbar, D. Givol, *ibid.* 15 (1977) 2706.
- [38] a) A. Skerra, A. Plückthun, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 1038; b) M. Bette, et al., *ibid.* 240 (1988) 1041.
- [39] K. Nagai, H. Thogersen, *Nature (London)* 309 (1984) 8110.
- [40] a) L. Pauling, *Am. Sci.* 36 (1948) 51; b) W. Jencks: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York 1969.
- [41] a) T. J. Borgford, T. E. Gray, N. J. Brand, A. R. Fersht, *Biochemistry* 26 (1987) 7246; b) C. C. Blake, *Proc. R. Soc. London B* 167 (1967) 378.
- [42] a) R. Wolfenden, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5 (1976) 271; b) P. Bartlett, C. Marlowe, *Biochemistry* 22 (1983) 4168.
- [43] a) S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science (Washington, D.C.)* 234 (1986) 1570; b) S. J. Pollack, P. G. Schultz, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 234 (1987) 1570; c) J. Jacobs, P. G. Schultz, R. Sugasawara, M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 2174; d) J. Jacobs, P. G. Schultz, in J. F. Liebman, A. Greenberg (Hrsg.): *Molecular Structure and Energetics, Vol. 10: Environmental Influences and Recognition in Enzymes Chemistry*, VCH Publishers, New York 1988, Kap. 11, S. 303–335; e) P. G. Schultz, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 426; f) S. J. Pollack, P. Hsuin, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck (1989).
- [44] a) A. Tramontano, K. Janda, R. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 234 (1988) 1566; b) A. Tramontano, A. Ammann, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 2282; c) A. Tramontano, K. Janda, A. O. Napper, S. Benkovic, R. A. Lerner, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52 (1987) 91; d) R. A. Lerner, A. Tramontano, *Sci. Am.* 258 (1988) 58.
- [45] P. Carter, J. A. Wells, *Nature (London)* 332 (1988) 564.
- [46] P. J. Gearhart, N. D. Johnson, R. Douglas, L. Hood, *Nature (London)* 291 (1981) 29.
- [47] N. Nishino, J. C. Powers, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 3482.
- [48] I. Schechter, M. Sela, *Biochemistry* 6 (1967) 897.
- [49] Benkovic et al. konnten kürzlich auch die stereospezifische Hydrolyse nicht aktivierter Ester chiraler Alkohole durch Antikörper demonstrieren (K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 244 (1989) 437).
- [50] C. N. Durfor, R. J. Bolin, R. J. Sugasawara, R. J. Massey, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8713.
- [51] K. D. Janda, D. Schloeder, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 1188.
- [52] D. Y. Jackson, J. W. Jacobs, R. Sugasawara, S. H. Reich, P. A. Bartlett, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4841.
- [53] a) S. D. Copley, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5306; b) K. Addadi, E. K. Jaffe, J. R. Knowles, *Biochemistry* 22 (1983) 4494; c) R. M. Coates, B. D. Rogers, S. J. Hobbs, D. R. Peck, D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 1160; d) P. R. Andrews, G. D. Smith, I. G. Young, *Biochemistry* 12 (1973) 3492; e) J. J. Gajewski, J. Jurayi, D. Kimbrough, M. E. Gande, B. Ganem, B. K. Carpenter, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 1170.
- [54] a) H. Gorisch, *Biochemistry* 17 (1978) 3700; b) E. Halsam: *The Shikimate Pathway*, Wiley, New York 1974; c) B. Ganem, *Tetrahedron* 34 (1978) 3353; d) G. L. Koch, D. C. Shaw, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* 258 (1972) 719.
- [55] a) S. G. Sogo, T. S. Widlanski, J. H. Hoare, C. E. Grimshaw, G. A. Berchtold, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2701; b) W. J. Guilford, S. D. Copley, J. R. Knowles, *ibid.* 109 (1987) 5013.
- [56] P. A. Bartlett, C. R. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7792.
- [57] D. Y. Jackson, P. G. Schultz, unveröffentlicht.
- [58] a) D. Hilvert, S. H. Carpenter, K. D. Nared, M. T. M. Auditor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 4953; b) D. Hilvert, K. D. Nared, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5593.
- [59] a) T. C. Bruice, U. K. Pandit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46 (1960) 402; b) D. W. Griffiths, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 1679; c) M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 1678.
- [60] A. D. Napper, S. J. Benkovic, A. Tramontano, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 237 (1987) 1042.
- [61] S. J. Benkovic, A. D. Napper, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5355.
- [62] K. D. Janda, R. A. Lerner, A. Tramontano, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4835.
- [63] W. P. Jencks, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 43 (1975) 219.
- [64] E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science (Washington, D.C.)* 226 (1984) 505; E. T. Kaiser, *Angew. Chem.* 100 (1988) 945; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 913.
- [65] a) S. J. Pollack, G. R. Nakayama, P. G. Schultz, *Science (Washington, D.C.)* 242 (1988) 1038; b) S. J. Pollack, G. R. Nakayama, P. G. Schultz, *Methods Enzymol.*, im Druck.
- [66] S. J. Pollack, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 1929.
- [67] B. L. Shokat, C. H. Leumann, R. Sugasawara, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* 100 (1988) 1227; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 1172.
- [68] a) F. Muller, *Top. Curr. Chem.* 108 (1983) 71; b) V. Massey, P. Hemmerich, *Biochem. Soc. Trans.* 8 (1980) 246.
- [69] B. L. Iversen, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 243 (1989) 1184.
- [70] D. A. Buckingham, D. M. Foster, A. M. Sargesson, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 6151.
- [71] W. Raso, B. Stollar, *Biochemistry* 14 (1975) 584.
- [72] A. Balan, B. Doctor, B. S. Green, M. Torter, H. Ziffer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 106. Es sei darauf hingewiesen, daß bei diesem Experiment das Serum und nicht der gereinigte Antikörper verwendet wurde.
- [73] Anmerkung bei der Korrektur (14. September 1989): Die Reinheit der monoklonalen Antikörper ist von größter Bedeutung, besonders wenn es ein Enzym gibt, das die interessierende Reaktion katalysiert. Wenn beispielsweise  $k_{cat}$  für einen katalytisch wirkenden (IgG) Antikörper  $1 \text{ min}^{-1}$  und für ein natürliches Enzym  $3 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$  beträgt, würde die Verunreinigung des Antikörpers mit  $6 \times 10^{-5} \%$  (mol/mol) bereits den Eindruck erwecken, daß der Antikörper katalytisch wirksam ist, während in Wirklichkeit doch das kontaminierende Enzym die beobachtete Beschleunigung bewirkt. Durch kinetische Analyse sowie anhand von Spezifitäts- oder Inhibitionsdaten kann man nicht immer zwischen der Katalyse durch einen Antikörper und der Katalyse durch ein verunreinigendes Enzym unterscheiden. Nach jedem Reinigungsschritt muß die spezifische Aktivität rigoros überprüft werden; dazu gehört auch ein Vergleich mehrerer Reinigungsmethoden mit komplettem Antikörper vs. isoliertes  $F_{ab}$ -Fragment. So haben wir es sehr schwierig gefunden, Glycosidase, Adenosin-Desaminase und Ribonuclease selbst mit beträchtlichem Aufwand (einschließlich Affinitätschromatographie) aus einer Präparation zu entfernen, die sich bei der Gelelektrophorese wie ein homogener Antikörper verhielt.
- [74] Anmerkung bei der Korrektur (14. September 1989): Benkovic et al. haben über Antikörper mit Lipaseaktivität, R- oder S-Substratspezifität und  $8 \times 10^4$ -facher Geschwindigkeitserhöhung berichtet (K. D. Janda, S. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington, D.C.)* 244 (1989) 437).
- [75] Anmerkung bei der Korrektur (14. September 1989): Kürzlich wurde ein Antikörper erzeugt, der die Bildung von Peptidbindungen katalysiert; P. G. Schultz et al., unveröffentlicht.