

Wstęp

Istotnym elementem każdego procesu biotechnologicznego jest biokatalizator. W określonym środowisku panującym w bioreaktorze o różnym stopniu złożoności, biokatalizator, czyli enzym, występujący w postaci wolnej bądź związanej z nośnikami rozpuszczalnymi czy nierozpuszczalnymi, względnie znajdujący się w komórkach drobnoustrojów czy też tkankach, katalizuje różne procesy biokonwersji. Optymalizacja produktywności enzymu w takim procesie wymaga właściwej kontroli biokatalizy, co sprowadza się głównie do stworzenia optymalnych warunków dla działania enzymu. Parametry, konieczne dla właściwego przebiegu niektórych procesów przemysłowych, nie zapewniają takich warunków, co może prowadzić do szybkiej destabilizacji enzymu i w konsekwencji do utraty aktywności. Tym chyba należy tłumaczyć, że mimo występowania w przyrodzie prawdopodobnie około 25 000 enzymów i zidentyfikowania oraz scharakteryzowania jedynie nieco ponad 2000, w sprzedaży znajduje się zaledwie około 300, a w większej skali, w przemyśle, stosuje się tylko kilkanaście. Nie jest zatem przesadą stwierdzenie, że olbrzymi potencjał katalityczny enzymów, ich wysoka specyficzność i możliwość działania w umiarkowanych warunkach pH, temperatury czy ciśnienia, nie są w pełni wykorzystane. Aby to zmienić prowadzi się intensywne badania nad modyfikacją enzymów, wykorzystując głównie metody chemiczne i inżynierię białkową (1). Badania te pozwoliły istotnie poszerzyć naszą wiedzę o katalizie enzymatycznej. Obecnie nie ma jeszcze możliwości projektowania i konstrukcji efektywnego biokatalizatora dla każdej pożądanej reakcji, szczególnie gdy konwersja określonych substratów wymaga użycia biokatalizatora w przyrodzie nie występującego lub jeszcze nie odnalezionego. Takie ulepszone biokatalizatory mogłyby znaleźć zastosowanie w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym i wielu nowoczesnych procesach biotechnologicznych.

Otrzymanie nowego katalizatora enzymatycznego wymaga przede wszystkim skonstruowania odpowiedniego, aktywnego centrum jego cząsteczki, z miejscem katalitycznym i miejscami wiążącymi określone substraty.

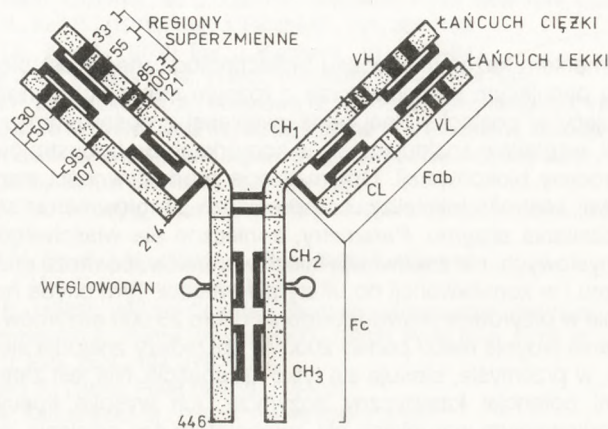
Białkami, które podobnie jak enzymy, specyficznie wiążą różne molekuly, są przeciwciała. W zasadzie nie wykazują one w żywych organizmach aktywności katalitycznej, aczkolwiek mogą indukować pewne zmiany strukturalne w przyłączonych cząsteczkach. Przeciwciała są wytwarzane przez system immunologiczny kręgowców, praktycznie względem niezliczonej liczby różnorodnych struktur molekularnych antygenów (2-4). Wykorzystanie energii wiązania przeciwciała z różnymi cząsteczkami do katalizy powinno prowadzić do powstania nowej generacji biokatalizatorów o określonej specyficzności, właściwościach i olbrzymich możliwościach aplikacyjnych (5-7).

Artykuł jest poświęcony katalitycznym przeciwciałom monoklonalnym, ich otrzymywaniu oraz możliwościom aplikacji. Dla lepszego wprowadzenia w zagadnienie zawiera też podstawowe informacje dotyczące przeciwciał i katalizy enzymatycznej.

1. Struktura i właściwości przeciwciał

System immunologiczny wszystkich kręgowców jest zdolny do rozpoznawania obcych związków – antygenów – i wytwarzania swoistych, komplementarnych białek, zwanych przeciwciałami lub immunoglobulinami. Białka te mogą rozpoznawać i unieczynniać niezwykle wiele

różnorodnych substancji, występujących lub mogących się pojawiać w naturze, stanowią zatem skuteczny mechanizm obrony organizmu przed inwazją obcych mu ciał. Szacuje się, że każdy osobnik wytwarza setki milionów różnych immunoglobulin (8), podzielonych na kilka klas (G, A, M, D i E), różniących się strukturą łańcucha peptydowego i fizjologiczną lokalizacją. Część cząsteczka przeciwciała jaką jest IgG składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych; dwu identycznych ciężkich (H) i dwu identycznych lekkich (L) (rys. 1).



Rys.1. Podstawowa struktura cząsteczki immunoglobuliny G (liczby wskazują reszty aminokwasowe; dokładny opis w tekście).

Posiada ona dwa miejsca wiążące antygen na końcu każdego regionu F_{ab} , który zbudowany jest z całego łańcucha lekkiego i około połowy ciężkiego. Obserwacje te poczynił Porter (3), kiedy po działaniu papainy na cząsteczkę immunoglobuliny otrzymał trzy fragmenty; dwa F_{ab} – zdolne do wiązania, ale nie wytrącające antygeny i trzeci F_c , który, jak wykazały badania krystalograficzne i sekwencji aminokwasów, jest podobny w różnych przeciwciałach. Wskazuje to, że różnorodność przeciwciał i ich heterogenność jest funkcją regionu F_{ab} . Na podstawie analizy sekwencji aminokwasów stwierdzono, że łańcuch L składa się z części zmiennej V_L i części stałej C_L , zawierających po 100–110 aminokwasów. W łańcuchu ciężkim występuje jedna część zmienna i różne liczby części stałych C_H , w zależności od klasy immunoglobuliny. Domeny V i C wykazują niewielką homologię sekwencji, podczas gdy V_H i V_L , C_{H1} i C_L , C i C_{H3} są homologiczne. Każda z domen składa się z 90 do 100 aminokwasów, z centralnie umieszczoną pętlą, wytworzoną przez mostki disiarczkowe (pogrubiona, czarna linia – rys. 1). Pomiędzy domenami C_{H1} i C_{H2} znajduje się tzw. region zawiasowy, zbudowany z 10–15 reszt aminokwasowych, bogaty w prolinę i cysteinę. Cysteina tworzy mostki disiarczkowe pomiędzy łańcuchami H, natomiast prolina nadaje giętkość tym łańcuchom, umożliwiając „zamykanie” lub „otwieranie się” cząsteczki immunoglobuliny. Kąt pomiędzy F_{ab} i F_c jest zmienny w różnych immunoglobulinach. W domenach V_L i V_H znajdują się co najmniej trzy superzmiennne regiony, decydujące o specyficzności antygenowej przeciwciała. To właśnie one w połączonym cząsteczce białka tworzą miejsca wiążące antygen. Badania krystalograficzne kompleksu przeciwciało–antygen wykazały, że miejsca wiążące znajdują się pomiędzy domenami V i V. Różnią się one kształtem i rozmiarem, w zależności od fizykochemicznych właściwości reszt aminokwasowych, występujących w superzmiennych obszarach poszczególnych przeciwciał (9,10). Immunoglobuliny są glikozy-

lowane zazwyczaj w regionie C_{H2} fragmentu F_C. Funkcja części węglowodanowej nie jest dokładnie poznana. Uważa się, że odgrywa ona istotną rolę w sekrecji niektórych klas immunoglobulin i w kontroli katabolizmu.

Wspomniano już, że antygeny są to substancje, które wprowadzone do ustroju wywołują odpowiedź immunologiczną. Niektóre proste związki w formie wolnej, zwane haptenami, nie wywołują odpowiedzi immunologicznej, natomiast nabywają tę właściwość, gdy przyłączy się je do nośnika, zazwyczaj białka lub wielocukru. Powstające przeciwciała reagują nie tylko z antygenem, który spowodował ich wytwarzanie, ale również z haptenem. Przeciwciała nie są skierowane przeciwko całej cząsteczce, lecz przeciw pewnym konfiguracjom atomów, tzw. determinantom antygenowym (epitopy). Małe antygeny mogą posiadać tylko jeden epitop; na dużej cząsteczce antygeny może występować wiele epitopów. Oznacza to, że w wielu przypadkach w stosunku do tego samego antygeny mogą być wytwarzane przeciwciała o zróżnicowanej strukturze.

2. Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych

Z przedstawionych informacji wynika, że system odpornościowy może wytwarzać przeciwciała swoiste względem prawie każdej substancji, jak i określonych fragmentów struktur. Obecnie dzięki potwierdzeniu hipotezy Barneta (11), według której każda komórka limfocyty B może wytwarzać tylko jeden typ przeciwciała o określonej specyficzności, izolacja pojedynczej linii limfocytów B i ich hodowla prowadzi do otrzymania jednego typu przeciwciała, tzw. przeciwciała monoklonalnego. Żywotność takiej linii komórkowej *in vitro* jest jednak zbyt krótka, aby można uzyskać odpowiednią ilość przeciwciał. Rozwiązanie tego problemu przyniosły badania Kohlera i Milsteina (12), którzy wykorzystując „nieśmiertelność” populacji komórek nowotworowych szpiku kostnego (szpiczaka), połączyli je z uczulonym na określony antygen limfocytami B. Otrzymana w wyniku fuzji hybryda komórkowa (hybrydoma) utrzymuje nowotworową zdolność do podziałów i zdolność do wytwarzania przeciwciała o określonej specyficzności, odziedziczoną po komórce limfocyty. Technologia hybrydoma może zatem być wykorzystana do produkcji monoklonalnych przeciwciał w nieograniczonej ilości.

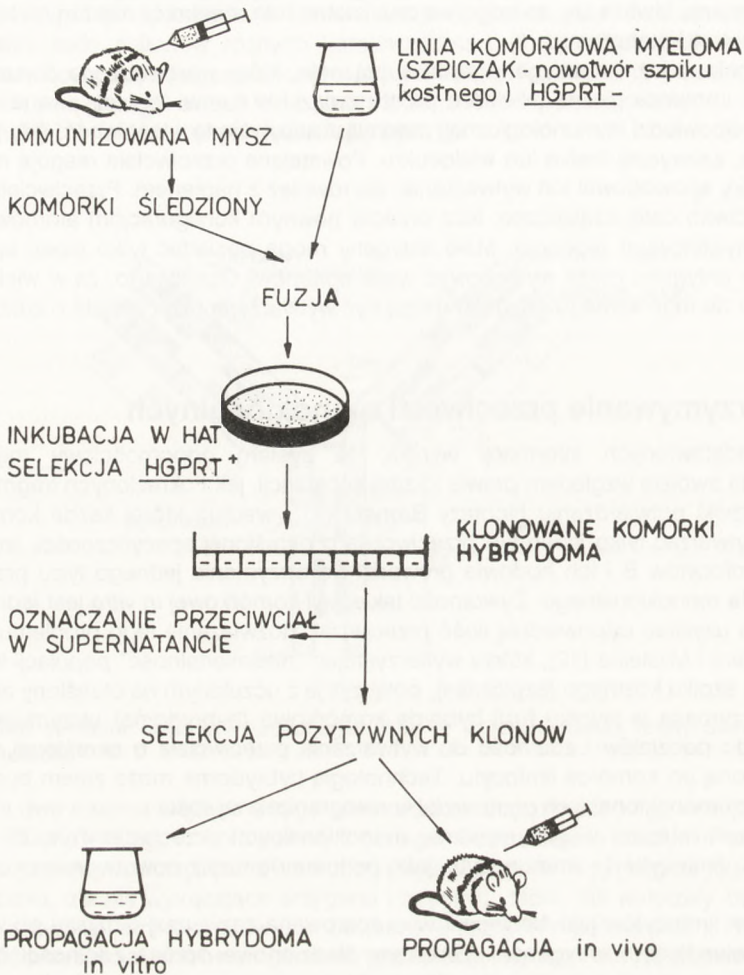
Pierwszym etapem w otrzymywaniu monoklonalnych przeciwciał (rys. 2) jest uzyskanie uczulonego limfocyty B – immunocyty, jako partnera do fuzji z nowotworową komórką plazmatyczną.

Źródłem limfocytów jest śledziona, wypreparowana zazwyczaj z myszy po wielokrotnej immunizacji określonym antygenem. Limfocyty śledzionowe oprócz zdolności do wytwarzania przeciwciała zawierają enzymy: transferazę hipoksantyno-guaninofosforybozylową (HGPRT) i kinazę tymidylanową (TK).

Drugim etapem produkcji monoklonalnego przeciwciała jest fuzja immunocyty z komórką plazmatyczną. Ta ostatnia linia komórkowa nie wytwarza enzymów HGPRT i TK oraz nie powinna wytwarzać własnych immunoglobulin. Fuzję prowadzi się zazwyczaj w polietylenoglikolu (PEG) (13). Po fuzji otrzymuje się mieszaninę komórek, składającą się z limfocytów o krótkiej żywotności, komórek hybrydoma oraz same komórki rakowe.

Następnym etapem jest hodowla hybrydoma. Stosuje się do tego celu selekcjonujące podłoże HAT, zawierające hipoksantynę, aminopterynę i tymidynę. Zawarta w tym podłożu aminopteryna blokuje endogenną syntezę nukleotydów, stąd inhibicja wzrostu komórek HGPRT⁻. W tych warunkach przeżywają tylko komórki HGPRT⁺, TK⁺, tj. komórki hybrydomy, mogące wykorzystywać obecne w podłożu HAT, egzogenną tymidynę i hipoksantynę.

Dalszym etapem w produkcji monoklonalnych przeciwciał jest selekcja klonów hybrydoma, wytwarzających żądane przeciwciała. Prowadzi się ją metodą seryjnych rozcieńczeń zawiesiny komórek hybrydoma i wysiewania ich na nowe mikroplątki hodowlane. Wyizolowane klony propaguje się *in vitro* lub *in vivo* w jamie otrzewnej (13).

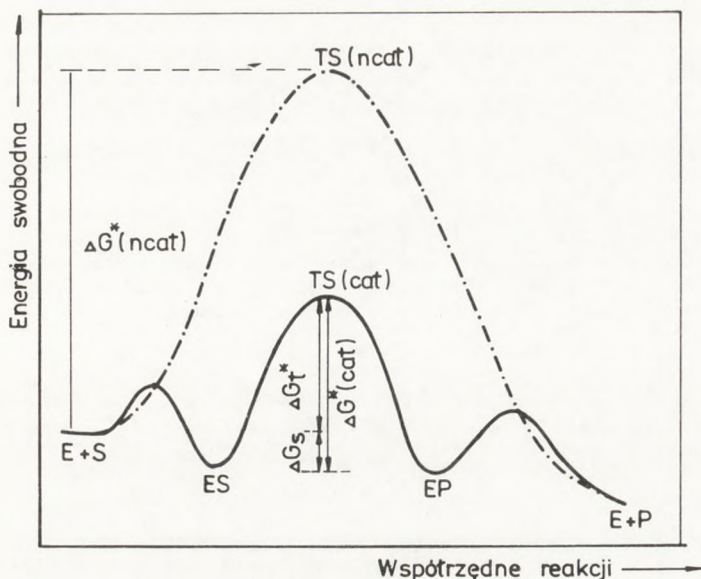


Rys.2. Schemat otrzymywania przeciwciał monoklonalnych (13).

3. Kataliza z użyciem monoklonalnych przeciwciał

Wiązanie pomiędzy przeciwciałem i antygenem o wysokiej specyficzności i powinowactwie (stała dysocjacji ok. $10^{-12} \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), powstałe w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, wodorowych, hydrofobowych czy sił van der Waalsa, jest analogiczne jak wiązanie enzymu z substratem. Miejsce wiążące przeciwciała może zatem spełniać wymagania stawiane aktywnemu centrum enzymu, w którym znajdują się odpowiednie miejsca wiążące substrat oraz grupy funkcyjne, uczestniczące w katalizie.

Każdy proces chemiczny można opisać, obrazując przemiany energetyczne w trakcie reakcji (rys. 3). Warunkiem niezbędnym do zajścia reakcji jest powstanie zaktywowanego stanu przejściowego (TS ncat), o większym zasobie energii swobodnej niż energia swobodna substra-



Rys.3. Hipotetyczny przebieg zmian energii swobodnej dla reakcji enzymatycznej (linia ciągła) i nieenzymatycznej (linia przerywana).

tów czy produktów. W tym mało stabilnym, bardzo dynamicznym stanie, wiązania chemiczne są tylko częściowo formowane lub degradowane. W reakcjach katalizowanych przez enzymy następuje przyłączenie się enzymu do stanu przejściowego (TS cat), jego stabilizacja i obniżenie energii aktywacji reakcji. Stała szybkości reakcji k jest funkcją energii aktywacji:

$$k = A e^{-\Delta G^*/RT}$$

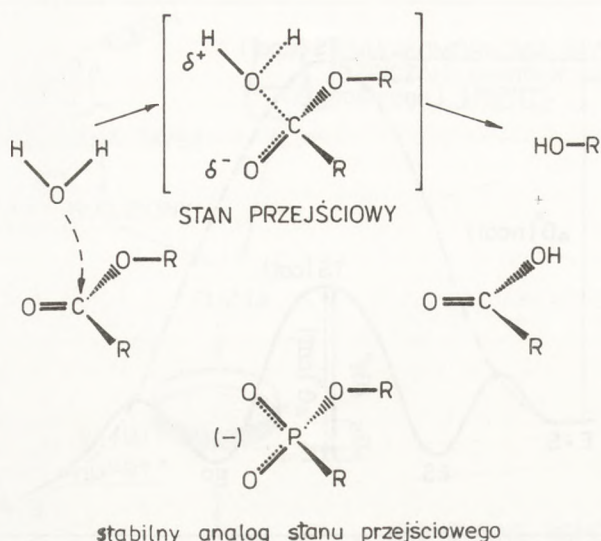
a więc nieznaczne nawet obniżenie bariery energetycznej, w zasadniczy sposób zwiększa szybkość reakcji. Z rys. 3 wynika, że energię aktywacji katalizowanej reakcji możemy określić równaniem:

$$\Delta G^*_{cat} = \Delta G_t + (-\Delta G_s)$$

Jeżeli enzym łączyłby się z substratem i stabilizował go przez tworzenie kompleksu enzym-substrat (ES), i w takim też stopniu łączyłby się ze stanem przejściowym przez tworzenie kompleksu enzym-stan przejściowy (TS_{cat}), to wynikowa stabilizacja byłaby równa 0, a w niektórych przypadkach $\Delta G^*_{cat} = \Delta G^*_{ncat}$. Dlatego też w katalizie enzymatycznej swobodna energia wiązania stanu przejściowego musi przewyższać swobodną energię wiązania substratu, a stopień katalizy będzie określony przez stosunek:

$$k_{cat}/k_{ncat} = K_t/K_s,$$

gdzie K i K_t to stałe powinowactwa dla tworzenia kompleksu enzym-substrat i enzym-stan przejściowy (15). Spostrzeżenia te poczynił Pauling już w 1946 r. (16). Zauważył on również, że różnica między enzymami i przeciwciałami polega na tym, że enzym łatwiej wiąże się z substratem, będącym w stanie wysokoenergetycznym, podczas gdy przeciwciało wiąże się z substratami niskoenergetycznymi.

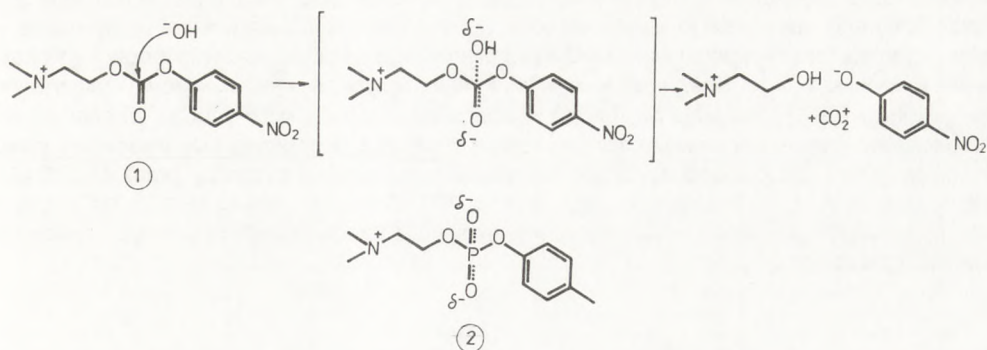


Rys.4. Reakcja hydrolizy estrów. Ester fosfonowy jest stabilnym analogiem stanu przejściowego.

Wytworzenie przeciwciał wiążących stan przejściowy reakcji narzuca wiele problemów praktycznych, związanych z koniecznością posiadania stabilnego antygeny, który po wprowadzeniu do zwierzęcia spowoduje indukcję syntezy przeciwciał. Nie ma antygenów reprezentujących stan przejściowy, gdyż jest on zbyt nietrwały. Rozwiązano ten problem również dzięki sugestii Paulinga, potwierdzonej później przez Jencksa (17), według której stabilna substancja odwzorowująca stan przejściowy zarówno pod względem kształtu, jak i ładunku, będzie się łączyć z centrum aktywnym enzymu i hamować jego katalityczną zdolność. Taki analog stanu przejściowego, jako związek stabilny, może być wykorzystany w charakterze antygeny i powodować wytworzenie przeciwciał, zdolnych do rozpoznawania rzeczywistego stanu przejściowego, stabilizowania go i działania katalitycznego.

Jedną z pierwszych reakcji wykorzystanych do sprawdzenia aktywności katalitycznej przeciwciał, była hydroliza estrów (rys. 4). Jest to typowa reakcja przenoszenia reszty acylowej (w tym przypadku na cząsteczkę wody) poprzez stan przejściowy, w którym następuje geometryczna zmiana układu, elektrostatyczna polaryzacja wokół grupy acylowej oraz naprężenie wiązań, połączone z ich wydłużeniem. Ten dynamiczny stan trwa około 10^{-13} s i oczywiście nie może być wykorzystany jako czynnik immunogeny. Zastępując centralny atom węgla fosforem, otrzymano estry fosfonowe, będące analogami stanu przejściowego (18). Mają one ładunek ujemny na atomach tlenu, dłuższe o 20% wiązanie P-O niż C-O oraz tetraedyczną konformację grupy fosfonowej, czym przypominają tetraedyczny atom węgla w rzeczywistym stanie przejściowym. Analogi te zastosowano jako hapteny i po połączeniu z białkiem immunizowano tymi konjugatami myszy. Otrzymano wiele przeciwciał, a wśród nich również i takie, które katalizowały reakcję hydrolizy estrów, przyspieszając ją $10^4 - 10^6$ razy (19,20).

Wiele informacji, dotyczących mechanizmu katalizy z udziałem monoklonalnych przeciwciał, dostarczyły badania dobrze scharakteryzowanych strukturalnie i genetycznie przeciwciał MOPC167 i T15, wiążących fosfocholinę (21,22). Przeciwciała te otrzymano po immunizacji myszy nitrofenylofosfocholiną (rys. 5, (2)). Immunoglobulina MOPC167 katalizowała hydrolizę ugrupowania węglanowego w chlorku 4-nitrofenylo-N-trimetyloaminoetylowęglań (rys. 5, (1)), zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten (rys. 6). Zanik aktywności katalitycznej tego przeciwciała



Rys.5. Reakcja hydrolizy chlorku stanu przejściowego 4-nitrofenylo-N-trimetyloaminoetylowęglanu -1 i analog stanu przejściowego 4-nitrofenylofosfocholiny -2.

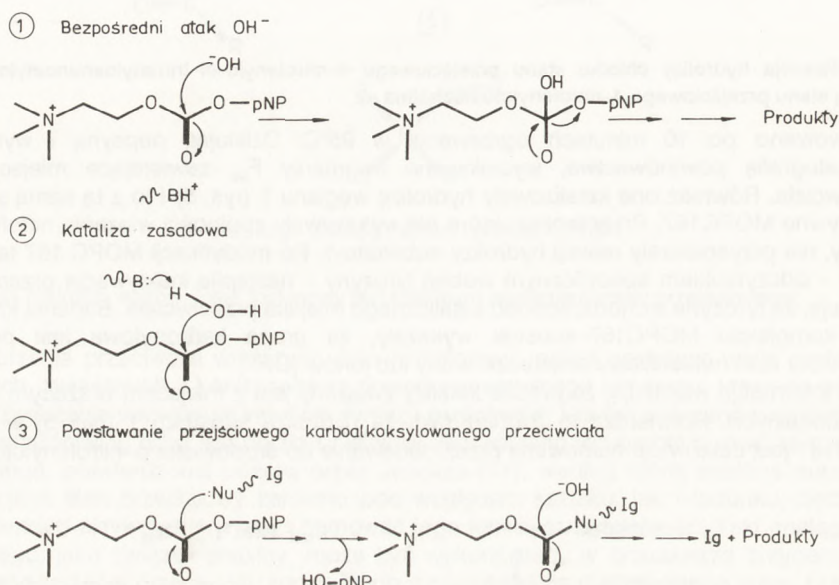
obserwowano po 10 minutach ogrzewania w 95°C. Działając pepsyną i wykorzystując chromatografię powinowactwa, wyizolowano fragmenty F_{ab} zawierające miejsca wiążące przeciwciała. Również one katalizowały hydrolizę węglanu 1 (rys. 5) i to z tą samą szybkością, co natywne MOPC167. Przeciwciała, które nie wykazywały zdolności wiązania nitrofenylofosfocholiny, nie przyspieszały reakcji hydrolizy substratu 1. Po modyfikacji MOPC 167 tetranitrometanem – odczynnikiem specyficznym wobec tyrozyny – nastąpiła inaktywacja przeciwciała, co wskazuje, że tyrozyna wchodzi w skład katalicznego miejsca przeciwciała. Badania krystalograficzne kompleksu MOPC167–substrat wykazały, że grupa karbonylowa jest podatna na zewnętrzny atak nukleofilowy cząsteczki wody lub jonów $[OH^-]$.

Te informacje wskazują, że proces katalizy związany jest z miejscem wiążącym przeciwciał monoklonalnych. Potwierdza to również fakt, że hydroliza substratu 1 (rys. 5) w obecności MOPC167 jest całkowicie hamowana przez dodawanie do środowiska p-nitrofenylofosfocholiny

SUBSTRAT	k_{cat} [min^{-1}]	K_m
	0.4 ± 0.04	$208 \pm 43 \mu M$
	brak hydrolizy	
	0.2 ± 0.04	$2 \pm 0.5 mM$
	1.07 ± 0.15	$650 \pm 120 \mu M$

Rys.6. Strukturalna specyficzność przeciwciała monoklonalnego MOPC 167 (22).

– analogu stanu przejściowego. Jeżeli rolą wiążącego miejsca przeciwciała jest stabilizacja stanu przejściowego, powstałego dzięki atakowi nukleofilowemu na kompleks przeciwciało – węglan 1, to należało się spodziewać zależności pierwszego rzędu od stężenia jonów hydroksylowych. Potwierdzono to doświadczalnie. Maksymalna szybkość reakcji V była zależna od stężenia jonów $[\text{OH}^-]$, zaś stała Michaelisa K pozostawała prawie niezmienna i wahała się od 200 do 250 μM (rys. 6). Ponieważ badany substrat może być bezpośrednio degradowany przez atak jonów $[\text{OH}^-]$, porównano szybkość tej reakcji z szybkością hydrolizy przez MOPC167. Stwierdzono, że wartość stosunku $k_{\text{cat}}/k_{\text{ncat}}$ wynosi 770. Zależność reakcji katalizy od stężenia jonów hydroksylowych może w konsekwencji wynikać z trzech prawdopodobnych mechanizmów reakcji (rys. 7):



Rys.7. Prawdopodobny mechanizm hydrolizy węglanów przez przeciwciało.

1) wiążące miejsce przeciwciała stabilizuje stan przejściowy reakcji i wtedy następuje bezpośredni atak jonu OH^- na spolaryzowany węglan. Funkcje stabilizacyjne przypisuje się Arg 52H, Tyr 33H i Lys 54H w przeciwciale;

2) reszty aminokwasowe znajdujące się w wiążącym miejscu przeciwciała aktywują cząsteczkę wody do ataku na kompleks przeciwciało–substrat;

3) nukleofilowe reszty wiążącego miejsca przeciwciała, np. Tyr 34H aktywuje substrat, tworząc związek pośredni – karboalkoksylowane przeciwciało – hydrolizowany następnie przez jony $[\text{OH}^-]$.

Kataliza z wykorzystaniem przeciwciała monoklonalnego zachodzi najprawdopodobniej według mechanizmu 1 lub 2. Brak nitrofenolanu w początkowej fazie reakcji eliminuje mechanizm typu 3.

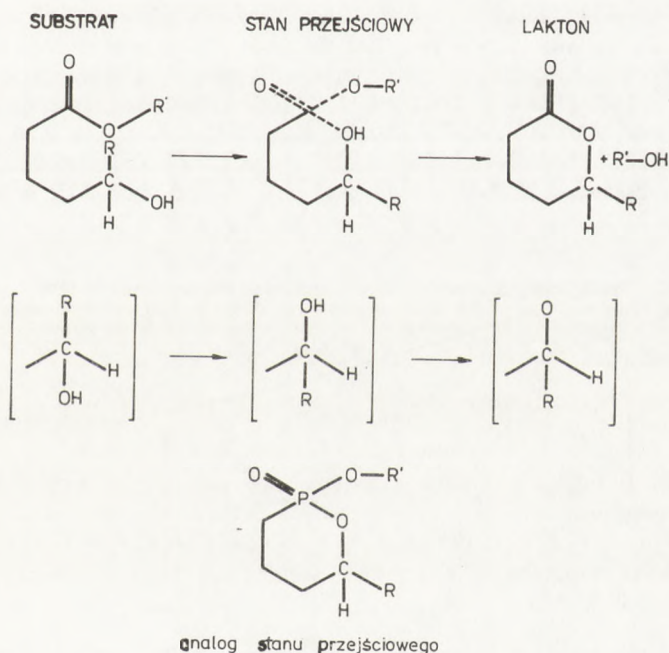
Istnieją również inne możliwości działania przeciwciał monoklonalnych jako katalizatorów. Wykorzystując hapteny z dodatnio naładowanymi grupami aminowymi, można otrzymać komplementarne przeciwciała z ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi, które znajdują się w określonej pozycji do substratu. Mogą one odszczepiać proton i prowadzić reakcję β -eliminacji.

cji (23,24). Wiążące miejsce przeciwciała może być też wykorzystane jako matryca, do której przyłącza się dwa substraty o odpowiedniej konfiguracji, co umożliwia powstawanie specyficznego produktu (25). Wprowadzenie odpowiedniej grupy funkcyjnej w pobliżu wiążącego miejsca przeciwciała może umożliwiać katalizę związanego substratu (26). W takich przeciwciałach miejsce wiążące służy do specyficznego wiązania substratu, a wprowadzona grupa funkcyjna odpowiada miejscu katalitycznemu w enzymach. Jeżeli wiążące miejsce przeciwciała potrafi odpowiednio zorientować kofaktory (np. NAD, fosforan pirydoksalu, jony metali) i substraty, można prowadzić wysoce specyficzne reakcje. Prawdopodobnie taki jest mechanizm reakcji hydrolizy wiązań peptydowych w obecności jonów metali prowadzonej z udziałem przeciwciał (27).

Wysoka specyficzność substratowa jest jedną z cech katalitycznych przeciwciał monoklonalnych. Z danych dotyczących reakcji hydrolizy różnych nitrofenylowęglanów (rys. 6) wynika, że ugrupowanie cholinowe substratu jest najważniejsze dla jego rozpoznania przez przeciwciało. Usunięcie z substratu dodatnio naładowanego jonu amonowego uniemożliwia prowadzenie reakcji hydrolizy węglanu, natomiast zamiana grupy N-metylowej na N-etylową lub wprowadzenie grupy metylowej do bocznego łańcucha metylenowego, powoduje wzrost K_m .

Katalityczne przeciwciała, wytwarzane w odpowiedzi na dokładnie zaprojektowany antygen, wykazują nie tylko wysoką specyficzność substratową i efektywność katalityczną, ale również i trzecią cechę, charakterystyczną dla enzymów, a mianowicie zdolność rozpoznawania różnych stereoisomerów. Tramontano i in. (5,18) badali stereospecyficzność katalitycznych przeciwciał monoklonalnych, wykorzystując reakcję cyklizacji hydroksyestru do δ -laktonu (rys. 8).

Zarówno substrat, stan przejściowy, jak i produkt tej reakcji zawierają chiralny atom węgla. Wykorzystując jako antygen pochodną amidową estru fosfonowego 2-fenoxy-2-oxo-6-(aminoetylo)-1,2-oxofosforynianu, przypominającą produkt reakcji cyklizacji, otrzymano przeciwciało przyspieszające reakcję około 170 razy (18). Otrzymano w niej tylko jedną formę laktonu.



Rys.8. Test na stereospecyficzność katalitycznych przeciwciał monoklonalnych.

Reakcja kończyła się po wykorzystaniu 50% substratu. Następną porcja substratu dodana do mieszaniny reakcyjnej również była wykorzystana tylko w 50%. Potwierdza to, że reakcja cyklizacji zachodzi tylko z jednym z enancjomerów.

4. Problemy związane z otrzymywaniem katalitycznych przeciwciał monoklonalnych

Istotnym zagadnieniem w otrzymywaniu odpowiednich katalitycznych przeciwciał monoklonalnych jest konstrukcja właściwego haptenu. W tym celu trzeba określić, który etap katalizowanej reakcji decyduje o jej przebiegu, jaki jest stan przejściowy tego etapu reakcji, co odróżnia stan przejściowy od substratu, jaka struktura chemiczna może odwzorowywać stan przejściowy. Dopiero odpowiedzi na wszystkie te pytania umożliwiają skonstruowanie odpowiedniego haptenu. Musi się on charakteryzować odpowiednią stabilnością, umożliwiającą proces immunizacji. Ważna jest też łatwość syntezy haptenu oraz dostępność reaktywnego miejsca, dzięki czemu można go łatwo skonjugować z nośnikiem (28). Dotychczas we wszystkich reakcjach hydrolizy estrów, amidów, węglanów, czy w wewnątrzcząsteczkowych reakcjach cyklizacji, stosowano jako hapteny fosfoniany lub fosfonoamidy, będące analogami tetraedrycznego węgla stanu przejściowego. Można też wykorzystać wiele innych związków odwzorowujących stan przejściowy i wykazujących zdolność inhibicji enzymów hydrolitycznych, takie jak np. difluoroketony czy kwasy borowe. Dla reakcji niehydrolitycznych, w których stan przejściowy jeszcze nie jest określony, jak też słabo poznany jest sam mechanizm katalizy, konieczne są dalsze badania.

Innym zagadnieniem jest skala produkcji przeciwciał monoklonalnych. Produkcja *in vivo* w jamie otrzewnej myszy jest mało wydajna i może być uważana za nieetyczną. Do otrzymania 1 kg przeciwciał potrzeba około trzech tysięcy myszy. Przeciwciała monoklonalne produkowane *in vivo* wydzielane są wraz z innymi, niespecyficznymi immunoglobulinami, których obecność znacznie utrudnia i podraża proces izolacji i oczyszczeniażądanego przeciwciała. Wyższą wydajność procesu zapewnia stosowanie technologii *in vitro* z wykorzystaniem różnego typu fermentorów. Już obecnie można otrzymać 1 kg przeciwciał monoklonalnych w pojedynczej hodowli w objętości 10 000 l lub w 10 szarżach, z zastosowaniem tysiąclitrowego fermentora. Proces oczyszczania przeciwciał monoklonalnych z takiej hodowli jest znacznie uproszczony, ze względu na niską zawartość białka i brak niespecyficzných immunoglobulin (29). Porównanie metod produkcji przeciwciał monoklonalnych *in vitro* i *in vivo* przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Produkcja przeciwciał monoklonalnych *in vivo* i *in vitro* (29)

	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
ilość monoklonalnych przeciwciał	1 – 10 mg/ml	10 – 200 μ g/ml
objętość	5 – 30 ml/mysz	wymiar fermentora
ilość operacji	wiele	jedna
warunki manipulacji	ograniczone	duże możliwości
obecność niespecyficzných immunoglobulin	tak	nie
możliwość redukcji zawartości białka w surowym preparacie	nie	tak

Odrębnym zagadnieniem, mającym wpływ na otrzymywanie katalitycznych przeciwciał monoklonalnych jest opracowanie odpowiednich metod wczesnego wykrywania klonów, produkujących pożądane przeciwciała. Można dzięki temu wyeliminować analizę przeciwciał wiążących

skonstruowany haptenu, ale nie wykazujących aktywności katalitycznej. Umiejętność wczesnego, bezpośredniego wykrywania właściwych klonów może znacznie podwyższyć jakość wytwarzanych przeciwciał i zwiększyć ich różnorodność.

5. Poprawa właściwości katalitycznych przeciwciał monoklonalnych

Zdolności katalityczne i inne właściwości przeciwciał monoklonalnych powinny być ulepszone, szczególnie pod kątem ewentualnego przemysłowego wykorzystania. Istnieje tu możliwość użycia metod stosowanych w ulepszaniu enzymów. Stabilność zależną od pH, temperatury, siły jonowej można poprawić stosując techniki immobilizacji, modyfikacji chemicznej czy inżynierii białkowej. Szczególnie obiecujące wydaje się wykorzystanie tej ostatniej techniki, np. do wymiany reszt aminokwasowych w centrum wiążącym przeciwciała monoklonalnego. Baldwin i Schultz (30) zastosowali metodę kontrolowanej punktowej mutagenyzy do podstawienia reszty histydyny w miejsce tyrozyny w pozycji 34 zmiennego łańcucha lekkiego V_L przeciwciała MOPC315, specyficznie wiążącego 2,4-dinitrofenol (DNP). Ekspresję syntetycznego genu, kodującego pierwszych 115 aminokwasów łańcucha lekkiego MOPC315, otrzymano w *E.coli*. Otrzymany fragment zrekombinowanego łańcucha lekkiego V_L połączono ze zmiennym łańcuchem V_H , pochodzącym z natywnego przeciwciała. Uzyskany hybryd domeny F_V MOPC315 z katalityczną grupą imidiazolową His przyspieszał 90 000 razy hydrolizę pochodnych estru DNP-kumaryna, a szybkość początkowa reakcji była 45 razy wyższa w porównaniu z reakcją katalizowaną przez natywne przeciwciało.

Podobnie jak zastosowanie w charakterze środowiska reakcji rozpuszczalników organicznych, czy odwróconych micelli, rozszerzyło zakres stosowania enzymów, tak zastosowanie niekonwencjonalnego środowiska katalizy może również rozszerzyć spektrum działania katalitycznych przeciwciał monoklonalnych (28).

6. Możliwość aplikacji katalitycznych przeciwciał monoklonalnych

Obecnie docenia się już możliwą rolę katalitycznych przeciwciał monoklonalnych dla wielu procesów biotechnologicznych, mimo iż jako katalizatory posiadają pewne wady (tab. 2). Wątpliwe, aby przeciwciała monoklonalne mogły zastąpić enzymy w przemianach naturalnych substratów. Jednakże można by wykorzystać je do syntezy specyficznych związków organicznych, szczególnie w tych procesach, w których istnieje konieczność wybrania jednej z wielu możliwych reakcji, np. podstawienia określonej grupy hydroksylowej w węglowodanach. Wysoka stereospecyficzność przeciwciał monoklonalnych może umożliwić otrzymanie enancjomerycznie czystych związków chemicznych. Katalityczne przeciwciała monoklonalne mogą być wykorzystane w biosensorach do selektywnego wiązania wykrywanych substancji, jak i do biokonwersji analizowanej substancji, którą można monitorować.

Szczególnie obiecującym obszarem wykorzystania katalitycznych przeciwciał jest medycyna. System immunologiczny organizmu można „poprawić” przez indukcję syntezy selektywnych przeciwciał wykazujących nie tylko zdolność wiązania toksyn, patogenów, itp., ale również zdolność ich destrukcji. Nawet nieznaczna aktywność katalityczna takich przeciwciał może istotnie zmniejszyć ich wprowadzaną dawkę, jak też skrócić czas terapii. Wprowadzenie do organizmu nieszkodliwych haptenu może zapewnić ochronę ustroju, dzięki cyrkulacji katalitycznych przeciwciał aktywnych wobec toksyn, bakterii, wirusów, czy komórek rakowych. Ostatnio stwierdzono obecność ludzkich autoprzeciwciał, katalizujących hydrolizę wiązań peptydowych (31). Identyfikacja przeciwciał, wykazujących wysoką efektywność katalityczną i działających jako

Tabela 2

Zalety i wady katalitycznych przeciwciał monoklonalnych (28)

Zalety	Wady
Szerokie zastosowanie, w szczególności w procesach, w których nie istnieje obecnie możliwość zastosowania odpowiednich enzymów czy katalizatorów chemicznych.	Niezbędne są szczegółowe informacje o mechanizmie reakcji.
Możliwość wykorzystania obecnie dostępnych technologii z udziałem biokatalizatorów.	Wysoki nakład robocizny, wymaga interdyscyplinarnych grup badawczo-rozwojowych.
Łatwość transferu technologii (warunki reakcji, immobilizacja, itd.) W przeciwieństwie do enzymów, cząsteczki przeciwciał mają wspólną, trójwymiarową strukturę i właściwości fizykochemiczne. Technologia opracowana dla jednego katalitycznego przeciwciała może być łatwo przeniesiona na inne przeciwciała.	Zastosowanie przemysłowe tylko do wysokowartościowych produktów. Ograniczenia podobne jak przy innych biokatalizatorach; niestabilność termiczna, podatność na biodegradację itp.

specyficzne proteazy może zmienić sposób leczenia niektórych chorób, jak również mieć duże znaczenie w ukierunkowanej hydrolizie białek *in vitro*, np. w przygotowaniu odpowiednich hydrolizatów białkowych. Możliwe jest też wykorzystanie takich przeciwciał do badania białek, podobnie jak enzymów restrykcyjnych, stosowanych w badaniach kwasów nukleinowych. Drogę, którą wykorzystuje się w otrzymywaniu katalitycznych przeciwciał monoklonalnych, można również zastosować w konstrukcji syntetycznych katalizatorów. W tym przypadku stabilny analog stanu przejściowego reakcji mógłby służyć jako matryca, wokół której następuje synteza polimeru. Odcisk analogu stanu przejściowego może działać jako miejsce wiążące i katalityczne. Być może takie katalizatory, jako bardziej trwałe od biopolimerów, staną się szczególnie użyteczne w przemyśle chemicznym (28).

Literatura

- Gacesa P., Hubble J., (1987), *Enzyme Technology*, Taylor and Francis, New York.
- Zaks A., Empie H., and Gross A., (1988), *Trends in Biotechnol.*, 6, 272-276.
- Owen M. J., Lamb J. R., (1988), *Immune Recognition*, IRL Press, Oxford Washington DC.
- Golding J. W., (1986), *Monoclonal antibody. Principles and practice*, Academic Press, New York.
- Lerner R. A., Tramontano A., (1988), *Scientific American*, 22/3, 42.
- Lerner R. A., (1984), *Adv. Immunol.*, 36, 1.
- Tramontano A., Janda K. D., Lerner R. A., (1986), *Science*, 234, 1566.
- Paszewski A., (1982), *Postępy Biochemii*, 28, 175.
- Valentine R. C., Green N. M., (1967), *J. Mol. Biol.*, 27, 615.
- Poljak R. J., Amzel L. M., Phizackerley R. P., (1976), *Prog. Biophys. Mol.*, 31, 67.
- Burnet F. M., (1959), *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity* Cambridge University Press, Cambridge.
- Kohler G., Milstein C., (1977), *Nature*, 256, 495.
- Butler M., (1987), *Animal Cell Technology: Principles and Products*, Taylor and Francis, New York.
- Pontecorvo G., (1975), *Cell Genet.*, 1, 397.
- Kraut J., (1988), *Science*, 242, 533.
- Pauling L., (1946), *Chem. Eng. News*, 24, 1375.
- Jencks W. P., (1969), *Catalysis in Chemistry and enzymology*, McGraw-Hill.

18. Tramontano A., et al, (1987), Gold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, LII, 91.
19. Tramontano A., Ammann A. A., Lerner R. A., (1988), J. Am. Chem. Soc., 110, 2282.
20. Durfor C. N., et al, (1988), J. Am. Chem. Soc., 110, 8713.
21. Pollack S. J., Schultz P. G., (1986), Gold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, I II, 97.
22. Pollack S. J., Jackobs J. W., Schultz P. G., (1986), Science, 234, 1570.
23. Shohat K. M., Schultz P. G., (1989), Nature, 338, 269-271.
24. Leatherbarrow R. J., (1989), Nature, 338, 206-207.
25. Balan A., et al, (1988), J. C. S. Chem. Comm., 106-108.
26. Pollack S. J., Schultz P. G., (1989), J. Am. Chem. Soc., 111, 1929.
27. Ivason B. L., Lerner R. A., (1989), Science, 243, 1184.
28. Green B. S., Tawfik D. S., (1989), Trends in Biotech., 7, 304.
29. Butler M., (1987), Animal Cell Technology: Principles and Products Taylor and Francis, New York.
30. Baldwin E., Schultz P. G., (1989), Science, 45, 1104.
31. Paul S., et al, (1989), Science, 244, 1158.

Catalytic monoclonal antibody

Summary

Over the past few years a new class of molecules which couple vast diversity of antibodies with the catalytic power has been successfully raised. They catalyze a variety of reaction like esters, amides and carbonates hydrolysis, cyclization reactions, asymmetric synthesis with high specificity including enantiomer specificity. In this article the properties, preparation and possible application of catalytic monoclonal antibodies are presented.

Adres dla korespondencji:

Stanisław Bielecki, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.

NOWOŚCI!

Nowy bezpieczny emulgator produktów spożywczych

W przemyśle spożywczym stosuje się w charakterze emulgatorów lecytynę z naturalnych źródeł, a także otrzymywane drogą syntezy chemicznej monoglicerydy, sorbitan, estry kwasów tłuszczowych i estry cukrów. Emulgatory syntetyzowane chemicznie powodują pewne trudności związane z barwieniem zemułgowanych produktów spożywczych oraz wynikające z obecności w nich resztek toksycznych rozpuszczalników. Wszystko wskazuje, że te problemy zostaną rozwiązane dzięki enzymatycznej syntezie nowych emulgatorów o pożądanych właściwościach. Taką substancją okazała się na przykład O-oleilo-L-homoseryna, w syntezie której wykorzystano lipazę z *Candida cylindracea*. Związek ten wykazuje kilkakrotnie wyższą aktywność w emulgacji mieszanin wodno-olejowych w porównaniu z takimi klasycznymi emulgatorami, jak kazeina, Tween 40, span 80 czy oleinian sodowy. Obecność O-oleilo-L-homoseryny w produktach spożywczych jest całkowicie bezpieczna, ponieważ hydrolizuje ją lipaza trzustkowa do naturalnie występujących L-homoseryny i kwasu oleinowego.

M.T.

Opracowano na podstawie: Nagao A. i Kito M, (1989), JACS, 66, 710-713.