

催化抗体研究新进展*

罗贵民

(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130023)

摘要 催化抗体也叫抗体酶, 是具有催化活性的免疫球蛋白. 由于它兼具抗体的高度选择性和酶的高效催化性, 因而催化抗体制备技术的开发预示着可以人为生产适应各种用途的, 特别是自然界不存在的高效催化剂, 对生物学、化学和医学等多种学科有重要的理论意义和实用价值. 综述了催化抗体研究的最新进展, 讨论了该领域目前存在的问题, 提出了解决这些问题的可能办法.

关键词 催化抗体, 抗体酶, 半抗原设计, 随机突变, 筛选

学科分类号 Q55, Q511

按照人们的意愿制备具有特定催化活力和专一性的蛋白质催化剂一直是重要的科学目标, 而催化抗体的制备就是这类从头进行酶设计的令人激动的方法之一. 催化抗体的开发标志着在酶工程领域中已经取得了巨大进展. 因为这个技术从原理上说, 几乎可以为任何化学转化提供全新的蛋白质催化剂, 只要能找到合适的过渡态类似物, 而且反应本身适合于水环境. 自 1986 年催化抗体的制备在实验上获得成功以来, 10 多年过去了, 已有不少综述报告论述了这一领域的进展情况^[1, 2]. 本文在概述近年来的主要进展之后, 着重讨论该领域存在的主要问题, 解决办法及今后的发展方向.

近年的主要进展表现在如下三个方面: 半抗原设计方法有创新; 抗体催化的化学转化范围有所扩大; 有些催化抗体的结构得到表征.

1 半抗原设计

由于针对某一反应过渡态产生的抗体应能加速这一反应, 因此, 制备稳定的过渡态类似物就成了制备催化抗体的关键. 首批催化抗体就是用过渡态类似物法成功构建的, 而且至今仍在广泛应用.

1.1 反应性免疫

最近出现一种很有用的方法叫“反应性”免疫^[3]. 它是利用“反应性”半抗原, 这种半抗原可在生理 pH 下释放出传统的过渡态类似物, 或者在免疫应答的 B 细胞水平上捕获亲核体. 用此方法产生的抗体可立体选择性水解甲氧萘丙酸 (图 1

中 1) 的芳基酯^[4]. 不稳定的磷酸二酯半抗原 2 诱导产生 5 个高度成熟的酯酶抗体催化剂, 其成熟程度可与许多酶相比. 类似的方法用于诱导具有 1 型醛缩酶活性的催化抗体. 1, 3-二酮半抗原 3 捕获抗体结合部位的亲核的赖氨酸残基 (图 1). 得到的两种抗体 33F12 和 38C2 能催化各种酮供体和醛受体底物之间的羟醛反应和许多 β -酮酸的脱羧反应. 最近的研究表明, 38C2 还可催化二酮 4 和 5 的对映体选择性分子内环化脱水反应^[5]. 将过渡态稳定化与通过反应性免疫在抗体生成期间所形成的化学反应性相结合, 这种方法虽然很新, 但已用它产生了许多优良的催化剂.

1.2 抗体酶的化学筛选

使用基于机理的筛选试剂可从抗体组合库中通过化学选择筛选出糖苷酶抗体^[6]. 半抗原 6 中糖苷键水解产生醛甲基化物 7, 它能共价捕获抗体库中的具有糖苷酶活力的 Fab (图 2). 筛选出的 Fab, 1B, 能催化水解 *p*-硝基苯基 β -半乳糖吡喃糖苷, 速度加强比 (*ER*) 为 70 000, 而用经典的过渡态类似物法所制备的最好的糖苷酶抗体, 其 *ER* 值仅有 100. 对于任何难解离的反应, 只要它能够通过反应中间物捕获抗体都可用化学选择法筛选出高效催化剂.

* 863 高技术计划 (103-13-01-05) 和国家自然科学基金 (29671014) 资助.

Tel: (0431) 8922331-3698, E-mail: gmluo@public.cc.jl.cn

收稿日期: 1999-06-23, 修回日期: 2000-01-06

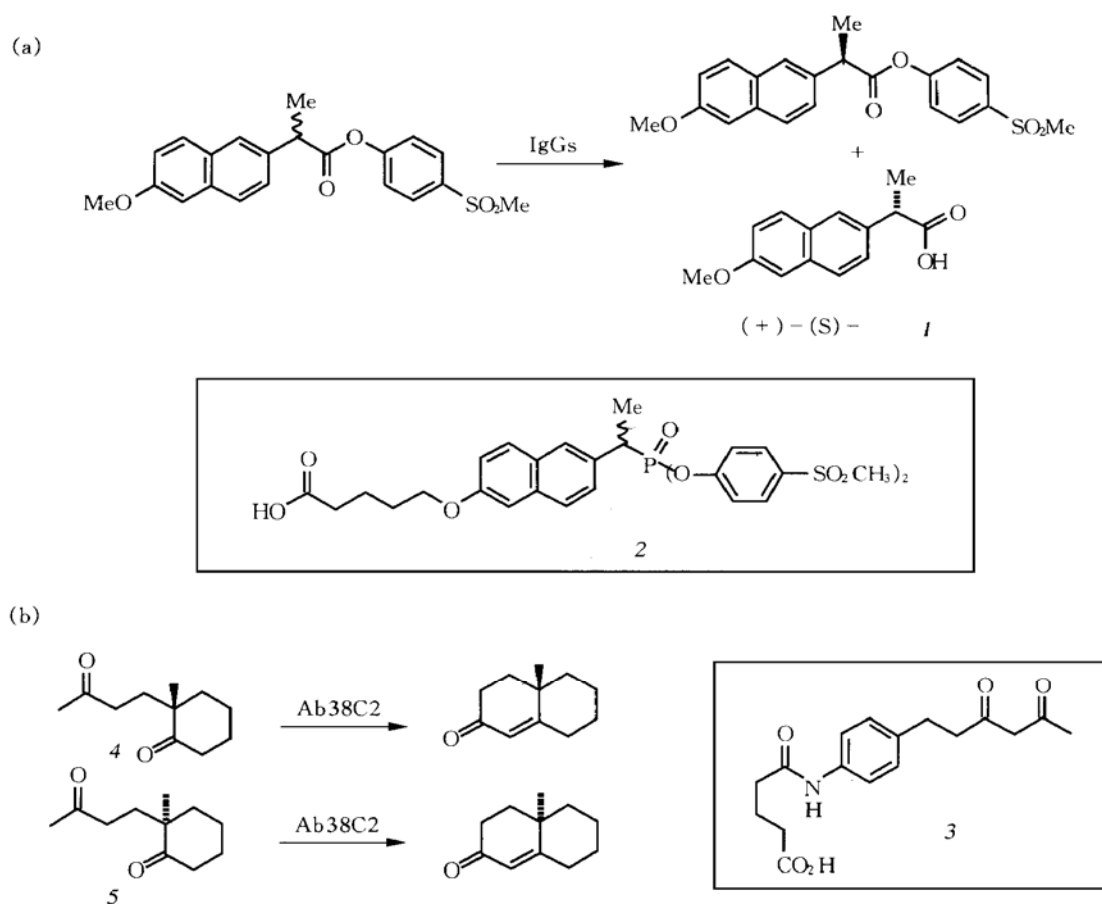


图1 反应性免疫

(a) 用磷酸二酯 2 作为半抗原, 诱导出立体选择性抗体酶, 可催化水解萘普生 1 的芳基酯; (b) β -二酮 3 诱导出醛缩酶抗体, 可催化二酮 4 和 5 的罗宾森成环反应。

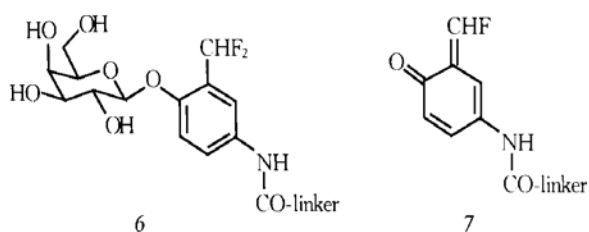


图2 半抗原 6 用于化学筛选糖苷酶抗体片段 Fab
酰甲基化物 7 可捕获并显示具有催化性质的 Fab。

2 抗体催化的化学转化

催化抗体是不对称合成的理想催化剂, 催化范围十分广泛, 可以说, 抗体酶能解决化学或区域选择性的任何问题。目前, 抗体催化的反应已达 80 余种, 而且还在不断增加。抗体原先催化的反应范围也由于重新设计半抗原而扩大, 催化效率也因此而得到改善。

2.1 阳离子环化反应

2.1.1 磷酸酯水解: 磷酸二酯键是自然界最稳定的键之一, 因此, 它的水解对抗体酶来说是个主要

的挑战。Janda 等利用稳定的五配位氧代铈(V)络合物 8 模拟 RNA 水解时形成的环形氧代正磷中间体, 产生单抗 2G12, 可以催化水解磷酸二酯 9, 催化速度常数 $K_{\text{cat}} = 1.53 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 米氏常数 $K_m = 240 \mu\text{mol/L}$; $K_{\text{cat}}/K_{\text{uncat}} = 312$ (图 3)^[7]。虽然该系统尚有很大改进余地, 但无疑这是一个抗体催化难进行反应的一个成功实例。Janda 等^[8]还用 N-氧化物半抗原 11 产生一种抗体酶 15C5, 能催化水解毒性杀虫剂对氧磷 10 (图 3), ER 值为 1 000。

2.1.2 芳基磺酸酯闭环反应: Lerner 小组^[9]将注意力集中在阳离子过渡态模拟物上, 他们用脒基离子化合物 12 作为半抗原, 产生的抗体可以催化芳基磺酸酯 13 的闭环反应(图 4), 由 12 引出的一个抗体 17G8 可催化 13 转化为 1,6-二甲基环己烯 14 和 2-甲烯-1-甲基环己烷 15 的混合物, 而背景环化则产生环己醇的混合物。这表明, 该抗体不仅能稳定所形成的阳离子, 而且还能激烈地从过渡态中排除水, 并控制环化后质子的丧失。

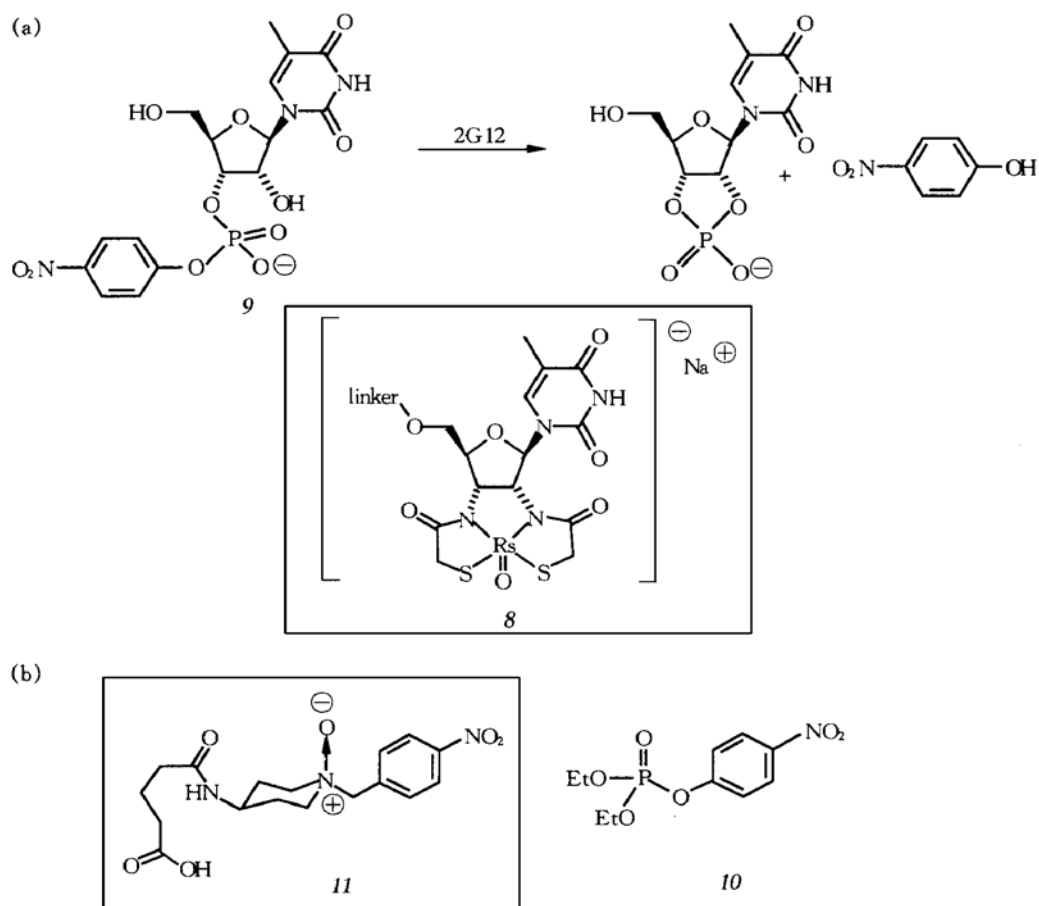


图3 磷酸酯水解作用

(a) 氧代钒(V)络合物8诱导出可水解9的磷酸二酯酶抗体; (b) 由N-氧化物半抗原11产生的抗体可解除杀虫剂对氧磷10的毒性.

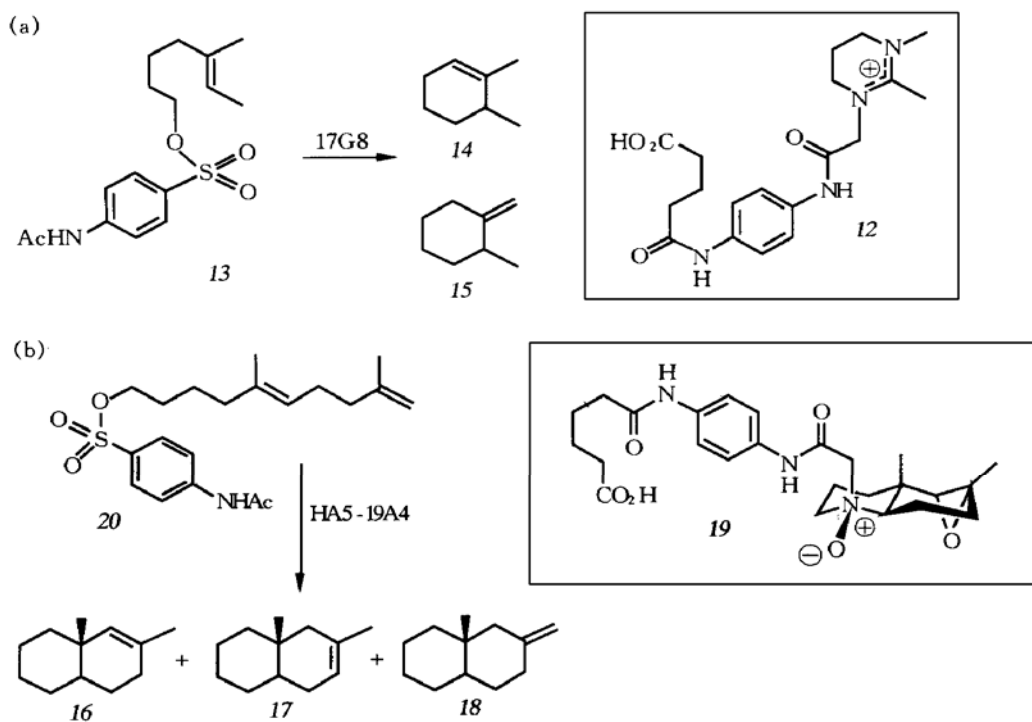


图4 阳离子环化反应

(a) 由脒基离子化合物12诱导出的抗体酶17G8可催化芳基磺酸酯13环化成碳环产物14和15; (b) 反式萘烷环氧化物19诱导出的抗体HA5-19A4可催化20环化成反式萘烷16~18.

2.1.3 萘烷形成: Lerner 小组^[10]继通过抗体催化阳离子环化产生手性环丙烷之后, 又实现了更有意义的同类型转化, 即萘烷 16~18 的形成(图4). 反式萘烷环氧化物 19 用作过渡态类似物半抗原, 筛选出的单抗 HA5-19A4 是环化芳烃磺酸酯 20 的最好催化剂, 环化产物分两部分: 烯属部分(16~18 的混合物)占 70%, 另外 30% 为环己醇, 16~18 的对映体过量值分别为 53%、53% 和 80%. 令人鼓舞的是抗体催化的这类转化可以推广到更复杂

的底物, 产生类似甾族化合物的分子. 产物的立体选择性和区域选择性完全可以与现有酶工艺相比, 从而打开了通向新的碳环系统的大门.

2.2 其他反应

针对磷酸酯 21 诱导的抗体 EA11-D7 可催化水解氨基甲酸酯药物前体 22, 释放出苯酚药物 23(图5)^[11]. 在由 EA11-D7 和 22 组成的分析系统中已证实对人结肠癌细胞生长有明显抑制作用.

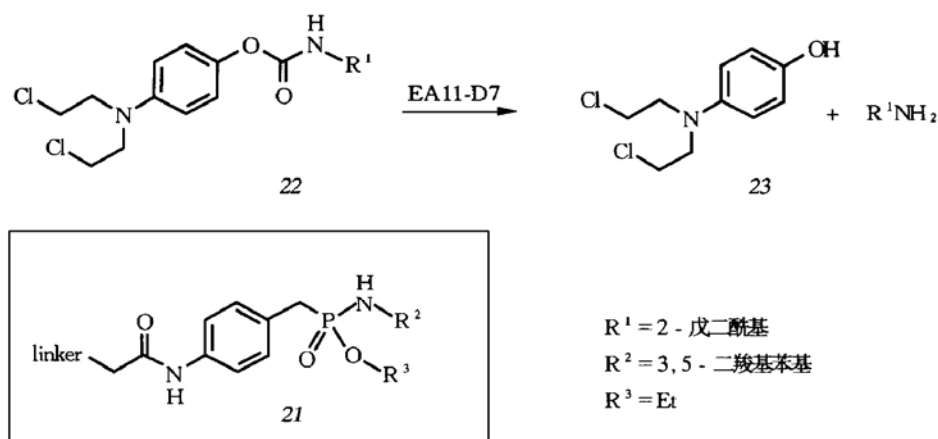


图5 磷酸半抗原 21 诱导出的抗体 EA11-D7 可催化氨基甲酸酯药物前体 22 水解成苯酚药物 23

Reymond 等^[12]描述一种产生硝酰基(HNO)的新方法, HNO 是体内第二信使 NO 的前体. 一种催化逆狄尔斯-阿德尔反应的抗体可从狄尔斯-阿德尔加成药物前体中释放出 HNO. 这个系统有控制咽喉炎作用.

肽基-脯氨酸异构酶(EC 5.2.1.8)是非常有效的普遍存在的一类酶, 能催化绕 P_r-脯氨酸酰胺键的旋转. 针对 α -酮酰胺半抗原诱导出的两个抗体, 可催化荧光底物的顺-反脯氨酸异构化^[13]. 反应加速的原因既有过渡态稳定化, 又有 P_r-脯氨酸酰胺键变形引起的基态不稳定化.

逆羟醛反应除用于化学合成外, 还在细胞代谢中起关键作用. 最近已有抗体能催化这一反应^[14]. 针对 β -羧基磷酸半抗原产生的抗体 29C5.1 可催化 β -硝基醇的分解反应, 与咪唑催化的二级速度常数比为 5×10^5 .

由于酶催化周环反应的例子相当罕见, 因此, 周环反应仍是这个领域关注的焦点. 现在已有 2 个关于抗体催化周环反应的新报告^[15, 16]. 前者讲述 [2, 3]-消除反应. 用 2, 4-双取代的四氢呋喃半抗原来模拟 N-氧化物底物消除成为苯乙烯产物的环化过渡态. 后者描述了抗体催化的硒代氧化物

(selenoxide) 消除反应. 用环化的吡咯烷模拟周环过渡态. 这些反应表明, 由半抗原设计所获得的熵控制, 加上溶剂效应, 可以产生独特的生物催化剂.

3 催化抗体结构研究

研究催化抗体结构的文章不多, 但最近有新进展. Schultz 小组制备了水解甲基对硝基苯基碳酸酯的抗体 48G7 与其半抗原 *p*-硝基苯基-4-羧基磷酸酯的复合物的晶体, 并对其进行了 X 射线衍射分析^[17], 发现抗体结合部位的共有模块含有碱性残基, 它能与磷酸氧发生静电相互作用, 产生所谓氧阴离子洞(oxyanion hole). 稳定半抗原是通过下列因素实现的: 带正电的 Arg-L96 与带负电的磷酸基靠近, 形成静电吸引; 由 His-H35, Tyr-H33 和 Tyr-L94 与磷酸基的氧所形成的氢键(图6).

Charbonnier 等^[18]对未配位的催化 Fab(结合抗原的抗体片段) D2.3, 它与底物类似物的复合物以及它与磷酸酯半抗原的复合物的 X 射线晶体结构进行了比较, 完全阐明了催化机理, 发现漏斗形的沟槽使水很容易扩散至深埋抗体中的反应中心. 反应中心在碱性 pH 下通过优先稳定带负电的

氧阴离子中间体而起作用, 中间体是由羟化物进攻 *p*-硝基苯基酯底物产生的.

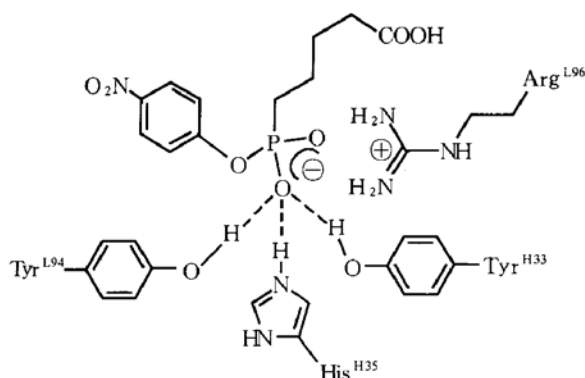


图6 与其磷酸半抗原(左)络合的抗体48G7(右)的结合部位结构

4 挑战与展望

4.1 催化抗体筛选

虽然用PCR和噬菌体技术构建的庞大的Fab蛋白组合库,可绕过动物免疫,直接从库中筛选有用抗体,从而大大促进催化抗体生产,但面对巨大的免疫系统资源,目前的筛选方法只能筛选其中的一小部分抗体.一般是通过对半抗原结合力的大小来筛选的,而不是通过催化活性来筛选.问题是对半抗原的亲合力最大,不一定是最好的催化抗体.我们在制备含硒抗体酶时就遇到这个问题.对半抗原亲和力小的抗体,其谷胱甘肽过氧化物酶活力反而高很多^[19].因此,开发通过催化活性直接筛选抗体酶是又一个挑战,但可以满怀信心地说,这个问题也是能够解决的,正在开发的catELISA法就强调了这个问题.

4.2 催化基团的最适装配

很多化学转化需要酸、碱或亲核基团参与,这类催化残基对需能反应特别重要.现在还不能通过免疫使这些基团在抗体中精确定位. Schultz小组利用抗体和半抗原间的电荷互补性,在抗体结合部位上诱导出一个具有催化活性的羧基.然而,这种方法是否具有普遍性,通过这种方法能否把2~3个这类基团引入抗体还有待证实,因此,表征对更有意义、更困难的化学转化具有中等以上活力的抗体是严峻挑战.

4.3 催化效率

虽然催化抗体是不对称合成的理想催化剂,其催化反应的范围也在不断扩大,然而,催化抗体现在还未达到实用阶段.对实用来说,来源、费用和可靠性都是要考虑的因素,但能否实用的关键因素

是催化效率:反应的时间是否合理,反应的收率是否可以接受.与酶的催化速度相比,目前所得到的大部分催化抗体的反应速度加强只能是中等水平的,其 K_{cat}/K_{uncat} 为 $10^3 \sim 10^4$,个别可达到 $10^6 \sim 10^7$,比酶催化低2~3个数量级.因此,如何提高抗体酶的催化效率,抗体酶将来能否与酶竞争是个公开挑战.

4.3.1 半抗原设计:当前抗体酶活力不高的主要原因是设计的半抗原类似物并不能与反应的过渡态完全吻合,因此与这种不完善类似物互补的抗体也就不能提供对真正过渡态的最适稳定化.再者,对多底物的多步反应来说,很难设计出一种合适的过渡态类似物.看来,这种“稳定过渡态类似物”法有相当大的局限性.事实上,Pauling的结合过渡态的思想只能是部分正确的.过渡态稳定化确实是催化作用产生的因素,但不是唯一的因素,或许对许多酶来说不是最重要的贡献因素.按照Menger^[20]的酶催化理论,底物有2个部位:结合部位和反应部位.使底物结合部位稳定化,同时使底物反应部位不稳定化(通过在反应部位的增加距离和去溶剂化作用)也是直接的催化潜力.因此,在分子的某处通过附加的引力接触拉紧底物应能催化反应.我们据此提出了“以底物修饰物为半抗原可以产生抗体酶”的思想.谷胱甘肽(GSH)是谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的专一性底物,此酶催化GSH与氢过氧化物反应是多步反应,因此没有合适的过渡态可供选择.我们以GSH的各种修饰物为半抗原,经化学诱变在抗体上引入催化基团后,产生了活力不同的抗体酶,活力高者超过了天然兔肝GPX活力^[19].这个例子说明,在不了解反应过渡态的情况下,也可以制备高活力抗体酶.

4.3.2 引入催化基团:以底物为半抗原所产生的抗体应当具有底物结合部位,然后在此抗体的结合部位上引入催化基团.如果引入的催化基团与底物结合部位取向正确、空间排布恰到好处,则应产生高活力抗体酶.引入催化基团的方法有: a. 利用部位选择性试剂,以类似亲和标记的方式定向地将催化基团引入抗体; b. 用DNA重组技术和蛋白质工程技术改变抗体的亲和性和专一性,引入酸、碱催化基团或亲核体.使用这类方法的关键在于要先对抗体的结构有所了解,确定工程化抗体的目标部位.在这方面目前已有成功实例.然而大多数抗体的结构是未知的,为了提高这类催化抗体的效率可采用随机突变法.

4.3.3 随机突变: 随机突变和经典的基因选择可在不了解活性部位情况下改善抗体的催化性质。这类方法可在微生物中模拟鼠免疫系统的行为,并可直接筛选催化功能,而不是筛选对过渡态类似物结合的紧密程度。最近开发的 DNA 改组技术 (DNA shuffling) 具有比随机突变法更高的成功几率。从 20 种已知的人干扰素基因,经 DNA 改组,得到 2 000 种子代基因,由这些基因产生的最好的干扰素在保护培养细胞抵抗鼠病毒的能力上比市售干扰素 α -2b 强 285 000 倍^[21]。因此,有理由相信,这类筛选方法与噬菌体显示文库技术相结合,可以创造与酶媲美的抗体催化剂。

总之,综合运用化学、分子生物学和遗传学知识改进催化抗体会大大加强催化剂设计方法的威力和可用性。从而产生医药、工业上有用的高效催化剂。显然只要在分子工程这个令人激动的前沿领域里持续工作,就会越来越接近这样的目标:能为任何一种化学转化设计类酶催化剂。

参 考 文 献

- Wentworth P Jr, Janda K D. Catalytic antibodies. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, **2**: 138~ 144
- Kirby A J. The Potential of catalytic antibodies. *Acta Chem Scand*, 1996, **50** (3): 203~ 210
- Wirsching P, Ashley J A, Lo G-H L, *et al.* Reactive immunization. *Science*, 1995, **270** (5243): 1775~ 1782
- Lo G-H L, Wentworth P Jr, Jung K W, *et al.* Reactive immunization strategy generates antibodies with high catalytic proficiencies. *J Am Chem Soc*, 1997, **119** (42): 10251~ 10252
- Zhong G, Hoffmann T, Lerner R A, *et al.* Antibody-catalyzed enantioselective Robinson annulation. *J Am Chem Soc*, 1997, **119** (34): 8131~ 8132
- Janda K D, Lo L-C, Lo G-H L, *et al.* Chemical selection for catalysis in combinatorial antibody libraries. *Science*, 1997, **275** (5302): 945~ 948
- Weiner D P, Wiemann T, Wolfe M M, *et al.* Pentacoordinate oxorhenium (V) metalochelate elicits antibody catalysts for phosphodiester cleavage. *J Am Chem Soc*, 1997, **119** (17): 4088~ 4089
- Lavey B J, Janda K D. Catalytic antibody mediated hydrolysis of paraoxon. *J Org Chem*, 1996, **61** (21): 7633~ 7636
- Hasserodt J, Janda K D, Lerner R A. Antibody catalyzed terpene cyclization. *J Am Chem Soc*, 1996, **118** (46): 11654~ 11655
- Hasserodt J, Janda K D, Lerner R A. Formation of bridge-methylated decalins by antibody catalyzed tandem cationic cyclization. *J Am Chem Soc*, 1997, **119** (26): 5993~ 5998
- Wentworth P Jr, Datta A, Blakey D, *et al.* Towards antibody directed abzyme prodrug therapy, ADAPT: carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its *in vitro* application to human tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (2): 799~ 803
- Bahr N, Guller R, Reymond J-L, *et al.* A nitroxyl synthase catalytic antibody. *J Am Chem Soc*, 1996, **118** (15): 3550~ 3555
- Yli-Kauhaluoma J T, Ashley J A, Lo G-H L, *et al.* Catalytic antibodies with peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J Am Chem Soc*, 1996, **118** (23): 5496~ 5497
- Flanagan M E, Jacobsen J R, Sweet E, *et al.* Antibody-catalyzed retro-aldol reaction. *J Am Chem Soc*, 1996, **118** (25): 6078~ 6079
- Yoon S S, Oei Y, Sweet E, *et al.* An antibody-catalyzed [2, 3]-elimination reaction. *J Am Chem Soc*, 1996, **118** (46): 11686~ 11687
- Zhou Z S, Jiang N, Hilvert D. Antibody-catalyzed selenoxide elimination. *J Am Chem Soc*, 1997, **119** (15): 3623~ 3624
- Patten P A, Gray N S, Yang P L, *et al.* The immunological evolution of catalysis. *Science*, 1996, **271** (5252): 1086~ 1091
- Charbonnier J B, Golinelli-Pimpaneau B, Gigant B, *et al.* Structural convergence in the active sites of a family of catalytic antibodies. *Science*, 1997, **275** (5303): 1140~ 1142
- Luo G M, Ding L, Zhu Z Q, *et al.* A selenium-containing abzyme, the activity of which surpassed the level of native glutathione peroxidase. *Ann NY Acad Sci*, 1998, **864**: 136~ 141
- Menger F M. Analysis of ground-state and transition-state effect in enzyme catalysis. *Biochemistry*, 1992, **31** (23): 5368~ 5373
- Cogh A. A sexual revolution. *New Scientist*, 1998, **160** (2161): 4

Recent Advances in Abzyme Studies. LUO Gu-Min (Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering of Educational Ministry, Jilin University, Changchun 130023, China).

Abstract Catalytic antibody (also known as abzyme) is a kind of immunoglobulin with catalytic activity. Because it has high selectivity and amazing diversity as antibodies and highly catalytic activities as enzymes, it is anticipated that using abzyme preparation technology one can obtain any kind of tailor-made biocatalysts, including those not occurred in nature, for various kinds of practical applications. Thus, abzyme study has an important value in theory and practice for biology, chemistry and medicine etc. The new advances of catalytic antibody research are summarized with a special emphasis on the breadth and scope of new antibody-catalyzed reactions and novel hapten design strategies. The problems to be solved in this field are discussed and the strategies for solving these problems are presented with special focus on increasing the catalytic activities of abzymes.

Key words catalytic antibodies, abzymes, hapten design, random mutagenesis, selection