Katalitička antitijela

Žužić, Lorena

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:596847

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Katalitička antitijela

Catalytic Antibodies

SEMINARSKI RAD

Lorena Žužić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Zagreb, 2014.

Sadržaj

1. Uvod **3**

2. Antitijela **3**

2.1. Izvor različitosti imunoglobulina **4**

3. Uspješnost enzima kao katalizatora **5**

4. Dizajniranje haptena **7**

4.1. Analozi prijelaznih stanja **7**

4.2. Metoda mamca i zamjene **9**

4.3. Entropijske zamke **10**

4.4. Desolvatacija supstrata **12**

5. Upotreba neobičnih kofaktora **13**

6. Katalitička antitijela kao terapeutici **14**

6.1. Anti-kokainska antitijela **14**

6.2. Aktivacija prolijekova **15**

7. Produkcija katalitičkih antitijela **16**

8. Ograničenja i budućnost **17**

9. Literatura **18**

10. Sažetak **21**

11. Summary **21**

1. Uvod

Enzimi, katalizatori kemijskih reakcija u biološkim sustavima, središnje su molekule svakog biokemijskog procesa. Njihova golema katalitička moć, visok stupanj specifičnosti i rad u blagim uvjetima temperature i pH čine ih nezamjenjivima u gotovo svim staničnim reakcijama. Pokušaji da se u laboratorijskim uvjetima imitiraju takvi moćni biokatalizatori nije nova – Polgar i Bender još su 1966. modificirali aktivno mjesto subtilizina transformacijom katalitičkog serina u cistein. Samo neki od raznovrsnih pristupa dizajnu umjetnih enzima obuhvaćaju modifikacije aktivnih mjesta prirodnih enzima, sintetske polimere s katalitičkom funkcijom, enzimske kofaktore pričvršćene za umjetnu proteinsku ili ugljikohidratnu strukturu ili spajanje više domena raznovrsnih proteina u funkcionalnu katalitičku jedinicu (Breslow 2005). Jedni od najvažnijih tipova umjetno stvorenih enzima su katalitička antitijela ili abzimi – molekule imunoglobulina koje imaju vlastitu katalitičku aktivnost. Spektar reakcija koje takvi enzimi mogu katalizirati je širok – osim što vrlo uspješno mogu poprimiti funkciju prirodnih enzima i katalizirati već poznate reakcije, prava vrijednost takvih molekula leži u činjenici da se mogu koristiti za ubrzanje reakcija koje se rijetko ili nikad ne događaju u prirodi. Osim toga, pojedina antitijela mogu se dizajnirati na način da pokazuju visok stupanj stereoselektivnosti, da kataliziraju reakcije koristeći nekonvencionalne kofaktore ili da se iz istih supstrata zbog stabilizacije različitih oblika prijelaznih stanja dobiju neočekivani produkti. Katalitička moć abzima je velika i pruža goleme mogućnosti za razvoj ne samo u domeni kemije, već i medicine.

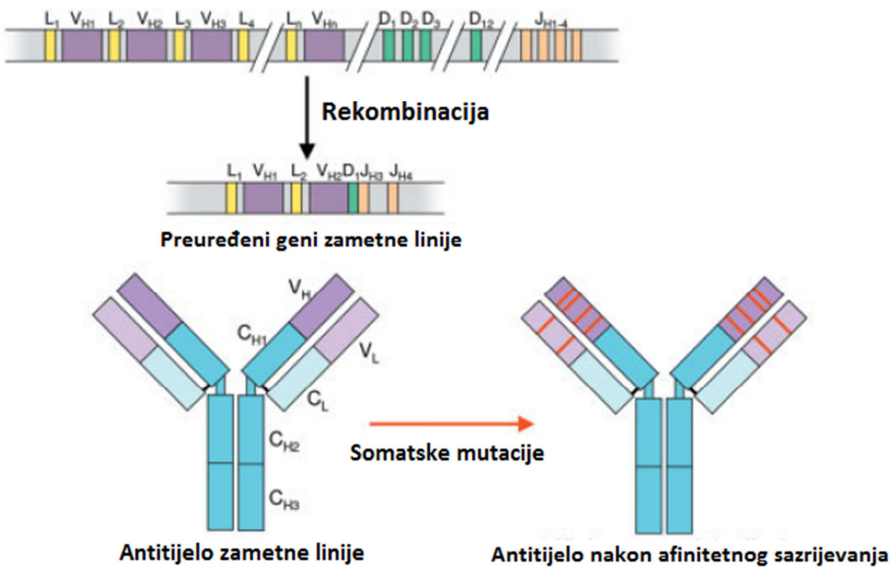
2. Antitijela

Antitijela ili imunoglobulini glavne su komponente humoralne imunosti te proizvod B limfocita. Sudjeluju u imunološkom odgovoru organizma specifičnim vezanjem za antigenske determinante, epitope, prilikom čega dolazi do neutralizacije antigena, aglutinacije čestica, precipitacije topljivih antigena te aktivacije komplementskog sustava (Andreis *i sur.* 2010). Antitijela su građena od četiri polipeptidna lanca, dva teška i dva laka lanca međusobno povezana disulfidnim vezama u protein koji nalikuje slovu Y. Ti proteini su simetrični i imaju dva vezna mjesta za antigen (paratope), a nalaze se na N-terminusu ulomka Fab[1] (Andreis *i sur.* 2010). Interakcije antitijela i antigena su nekovalentne, reverzibilne i prilično jake, s konstantom disocijacije (K_d) u rasponu od 10^{-4} do 10^{-14} M, koja je rezultat raznih ionskih, van

[1] Razgradnjom antitijela biljnom proteazom papainom dobivaju se tri ulomka: dva identična Fab (engl. *fragment antigen binding*) te jedan Fc (engl. *fragment crystallizable*).

der Waalsovih, hidrofobnih interakcija ili vodikovih veza između epitopa i paratopa (Rao i Wootla 2007, Nelson i Cox 2008).

2.1. Izvor različitosti imunoglobulina



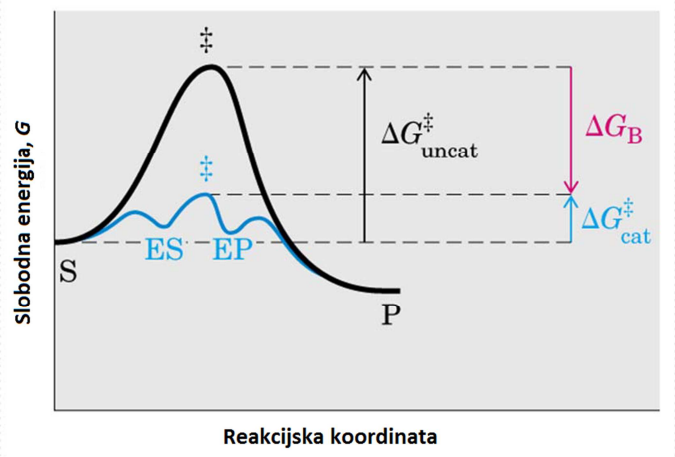
Slika 1. V(D)J rekombinacija i sazrijevanje antitijela. Preuzeto i prilagođeno iz Yin i Schultz (2005).

Posebnost imunološkog sustava je mogućnost prepoznavanja gotovo svakog antigena koji dolazi u dodir s imunološkim sustavom pomoću specifičnih antitijela – u svakoj jedinci je prisutno oko 10^8 različitih antitijela koja mogu prepoznati čak 10^{11} antigenskih determinanti (Rao i Wootla 2007, Andreis *i sur.* 2010). Pitanje na koji način je organizam sposoban stvoriti toliko golemi spektar različitih proteina iz ograničene količine genetskog materijala u stanici dugo je vremena pobuđivalo znanstveni interes. Teorija zametne loze, koja je pretpostavljala da genom sadrži sve gene potrebne za svako različito antitijelo, te teorija somatske mutacije, koja je pak tvrdila da je broj imunoglobulinskih gena skroman ali su oni podložni mutacijama, odbačene su jer je potpuno objašnjenje fenomena raznolikosti antitijela dao model somatske rekombinacije (Gearhart 2006, Andreis *i sur.* 2010). Taj model srušio je dotad dogmatičnu tvrdnju genetike da jedan gen nužno kodira za jedan polipeptid jer je dokazano da su polipeptidni lanci antitijela kodirani pomoću više gena – tri za lake i četiri za teške lance (sl. 1). Varijabilni dijelovi lakih lanaca kodirani su genima V (engl. *variable*) i J (engl. *joining*), dok za konstantni dio lanca kodira C gen (engl. *constant*). Teški lanci kodirani su na sličan način kao i laki lanci – razlika je u četvrtom genu D (engl. *diversity*) koji se umeće između V i J gena. Na kromosomu postoji više gena za svaki dio polipeptidnog lanca – primjerice, čovjek

posjeduje oko 100 V, 30-tak D i 6 J gena za teški lanac antitijela (Andreis *i sur.* 2010). Djelovanjem V(D)J rekombinaza u procesu sazrijevanja B limfocita geni se nasumično prespajaju i naposlijetku formiraju niz V-J-C za lake, odnosno V-D-J-C za teške lance. Somatska rekombinacija stoga se često u literaturi spominje i pod nazivom V(D)J rekombinacija. Osim mnoštva gena V, D i J zametne loze te njihove rekombinacije, različitost antitijela je dijelom rezultat djelovanja terminalne deoksinukleotidil-transferaze koja na mjestima lomova dodaje do 15 nasumično poredanih nukleotida, somatske hipermutabilnosti gena te kombiniranja teških i lakih lanaca u istu molekulu antitijela (Andreis *i sur.* 2010).

Sličnosti između sazrijevanja antitijela i evolucije enzima su jasne. Oba procesa uključuju rekombinacije, točkaste mutacije i duplikacije gena u sprezi sa procesom selekcije u kojem su iz golemog spektra različitih proteina izdvojene molekule željenih karakteristika (Yin i Schultz 2005). Ključne razlike leže u prostoru i vremenu na kojima se evolucija tih molekula događa. Evolucija enzima odvija se milijunima godina; evolucija antitijela traje samo nekoliko tjedana. Selekcija enzima odvija se na na prostoru cijele populacije; antitijela poželjnih karakteristika biraju se u jednoj jedinoj jedinci. Dakle, stvaranje antitijela posjeduje karakteristike evolucijskog procesa, ali u puno manjem opsegu u usporedbi s evolucijom drugih molekula. Stoga se sazrijevanje antitijela može smatrati „evolucijom u malom“.

3. Uspješnost enzima kao katalizatora



Slika 2. Slobodna energija sustava u ovisnosti o tijeku kemijske reakcije S → P. Preuzeto i prilagođeno iz Nelson i Cox (2008).

Enzimi su makromolekule, najčešće proteini, koje kataliziraju neku kemijsku reakciju tako što smanjuju njenu energiju aktivacije – razliku energija osnovnog i prijelaznog stanja. Prijelazno stanje nije stabilna kemijska forma, već struktura u tijeku katalitičke reakcije iz koje je prijelaz u supstrat ili u produkt jednako vjerojatan (Nelson i Cox, 2008). Najveća prepreka svake kemijske reakcije je energetska barijera koja se pojavljuje u prijelaznom stanju (sl. 2). Linus Pauling (1948) naglašavao je

važnost komplementarnosti enzima i prijelaznog stanja u katalizi, na taj način pobijajući prijašnje shvaćanje Fischera (1894) koji je tvrdio da je za katalizu ključna komplementarnost između enzima i njegovog supstrata. Vezna energija koja potječe iz interakcije enzima i prijelaznog stanja smanjuje energiju aktivacije, što za posljedicu ima povećanje brzine katalizirane reakcije. Dakle, za uspješnu katalizu potrebna je stabilizacija prijelaznog stanja u aktivnom mjestu enzima, prilikom čega dolazi do oslobađanja vezne energije, smanjivanja energije aktivacije i ubrzavanja kemijske reakcije.

Nelson i Cox (2008) napominju kako je razlika između specifičnosti i katalize teško razlučiva – oba fenomena zahtijevaju optimalno pozicionirane funkcionalne grupe koje formiraju višestruke nekovalentne interakcije između enzima i molekule. Kao što je već navedeno, specifičnost antitijela očituje se u vezanju epitopa antigena za odgovarajući paratop antitijela. Uzevši u obzir tu činjenicu, nameće se pitanje: zašto antitijela nemaju katalitičku aktivnost? Osnovna je razlika u vrsti molekule za koju je određeni protein specifičan. Antitijelo se veže za antigensku determinantu, stabilnu molekulu i ekvivalent supstrata u enzimatskoj reakciji, dok enzim ostvaruje najveći broj interakcija s nestabilnim prijelaznim stanjem katalizirane reakcije. Iz navedenog je jasno da su katalitička antitijela moguća ako se specifičnost vezanja usmjeri prema prijelaznom stanju, a ne prema supstratu reakcije. Tu je misao prvi formulirao William Jencks (1969, p. 288):

„Ako komplementarnost između aktivnog mjesta i prijelaznog stanja značajno pridonosi enzimatskoj katalizi, konstruiranjem takvog aktivnog mjesta trebalo bi biti moguće sintetizirati enzim. Jedan način da se to postigne je stvaranje antitijela za hapten koji nalikuje prijelaznom stanju željene reakcije. Vezno mjesto takvih antitijela trebalo bi biti komplementarno prijelaznom stanju i uzrokovati ubrzanje tako što prisiljava vezani supstrat da nalikuje prijelaznom stanju.“

Hapteni, koje Jencks spominje, male su molekule koje same za sebe nisu sposobne izazvati imunološki odgovor. Kako bi hapteni (u ovom slučaju analozi prijelaznog stanja) potaknuli stvaranje specifičnih antitijela, potrebno ih je vezati za prikladne nosače (Andreis *i sur*. 2010).

Međutim, iako zasluga za ideju o abzimima doista pripada Jencksu, prva katalitička antitijela proizvedena su u laboratoriju tri godine ranije kada je Slobin (1966) primijetio hidrolitičku aktivnost zečjeg antitijela protiv *p*-nitrofenilnog estera. Napokon, ne smije se zaboraviti da nastanak katalitičkih antitijela nije isključivo ograničen na kontrolirane

laboratorijske uvjete – pokazano je da prirodni abzimi nisu neobična pojava u sistemskim autoimunim bolestima. Antitijela koja hidroliziraju DNA i RNA izolirana su iz seruma pacijenata koji boluju od sistemskog *lupus erythematosus*, dok je u slučaju kroničnog bronhitisa detektirano antitijelo koje hidrolizira VIP (engl. *vasoactive intestinal peptide*) (Ali *i sur*. 2008).

4. Dizajniranje haptena

4.1. Analozi prijelaznih stanja

Iako u osnovi jednostavna ideja, umjetna proizvodnja funkcionalnih katalitičkih antitijela i dalje predstavlja velik izazov. Najveća prepreka ostaje dizajn analoga prijelaznih stanja. Kao što je već naglašeno, prijelazno stanje nije definirana molekula, već hipotetska struktura, često s nepotpuno formiranim kemijskim vezama, koja se pojavljuje u tijeku kemijske reakcije u trenutku kad je slobodna Gibbsova energija najviša (Blackburn i Garçon 2000). Stoga je poznavanje strukture takve kemijske forme iznimno teško, podložno različitim interpretacijama i često rezultat indirektnih zaključaka donesenih na temelju sličnih kemijskih reakcija. U nekim slučajevima, za proučavanje strukture prijelaznih stanja koriste se tehnike laserske femtokemije ili kalkulacije molekulskih orbitala (Blackburn i Garçon 2000). Kao nagovještaj moguće strukture prijelaznog stanja mogu poslužiti reakcijski intermedijeri. Intermedijeri su sve molekule u tijeku kemijske reakcije koje traju dulje od jedne molekulske vibracije, 10^{-13} sekundi (Nelson i Cox 2008). Dakle, iako često traju vrlo kratko, njihova struktura je, za razliku od prijelaznih stanja, u potpunosti definirana. Stabilizacijom reakcijskih intermedijera i korištenjem spektroskopskih tehnika može se odrediti struktura takvih molekula (Blackburn i Garçon 2000). Međutim, ne smije se smetnuti s uma da intermedijeri nisu prijelazna stanja te mogu ponuditi jedino indikacije o njegovoj strukturi, ali ne i čvrste dokaze. Dodatnu komplikaciju predstavlja veći broj intermedijera u tijeku kemijske reakcije. Hammondov postulat u tom slučaju predviđa da prijelazno stanje strukturom više nalikuje onom intermedijeru koji ima višu slobodnu Gibbsovu energiju (Hammond 1955).

Naravno, čak i ako se s velikim stupnjem vjernosti uspije definirati struktura prijelaznog stanja, problem predstavlja dizajn analoga koji bi dovoljno vjerno prikazivao prijelazno stanje, ali za razliku od njega zadržao stabilnost strukture. Čak i najmanja razlika između prijelaznog stanja i njegovog analoga pridonosi smanjenoj učinkovitosti katalitičkog antitijela da katalizira kemijsku reakciju (Hilvert 2005). Vrlo detaljno poznavanje tijeka kemijske reakcije neophodno je za uspješnu konstrukciju funkcionalnih analoga prijelaznih

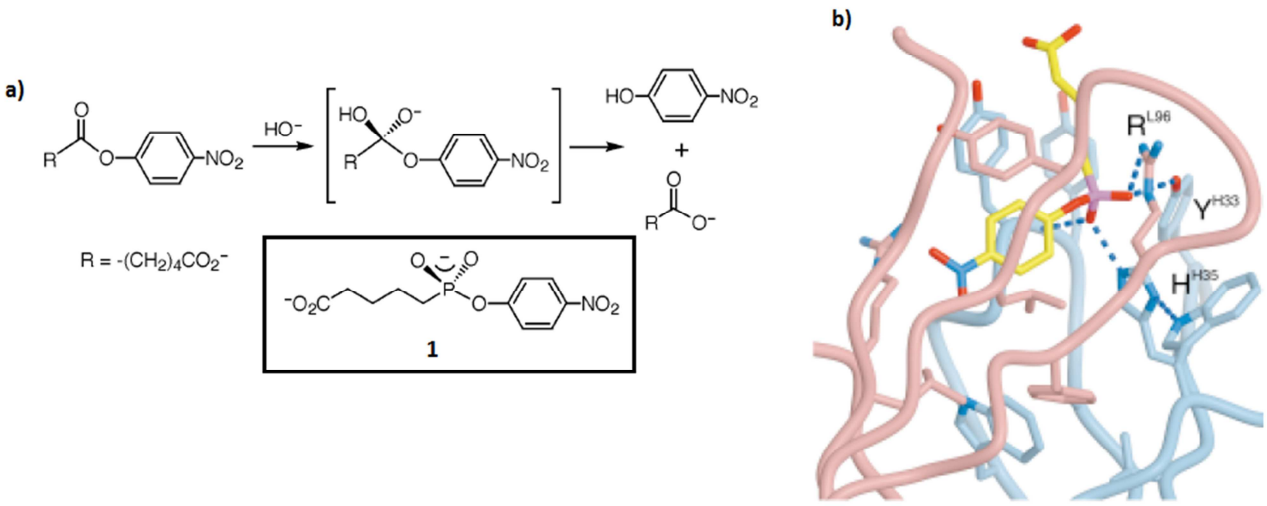
stanja – stoga ni ne iznenađuje da je većina reakcija za koje su uspješno proizvedena katalitička antitijela jednostavna i s malim brojem reakcijskih koraka i supstrata (Blackburn i Garçon 2000).

Prvi uspjesi u proizvodnji katalitičkih antitijela vezani su uz katalizu hidrolitičkih reakcija uz uporabu analoga tetraedarskog intermedijera kao haptena. Pollack *i sur.* (1986) proizvode antitijelo MOPC167 koje hidrolizira *p*-nitrofenilkarbonat, dok Tramontano *i sur.* (1986) izvještavaju o monoklonskom antitijelu sposobnom hidrolizirati karboksilne estere. Čak i danas, reakcije prijenosa acilne skupine ostaju jedne od najproučavanih kemijskih reakcija i razlog zašto je velik dio istraživanja katalitičkih antitijela baziran upravo na njima (Blackburn i Garçon 2000). Većina takvih reakcija uključuje dva ključna koraka: adiciju nukleofila, vrlo često molekule vode, te odlazak visokoenergetske izlazne skupine. Koraci su odijeljeni tetraedarskim intermedijerom koji strukturom nalikuje prijelaznom stanju i čiji su analozi poslužili za dobivanje funkcionalnih katalitičkih antitijela u reakcijama hidrolize alkilnih i arilnih estera, karbonata, i rjeđe, amida (Hilvert 2005). Osim tetraedarske strukture, važna značajka analoga takvog intermedijera je negativni naboj molekule koji osigurava uspješnu katalizu ovakvih kemijskih reakcija. Naime, utvrđeno je da je jedno od ključnih obilježja prirodnih esteraza i peptidaza oksianionska udubina – prostor u aktivnom mjestu koji vodikovim vezama s amidnim skupinama dvije peptidne veze enzima stabilizira oksianion tetraedarskog intermedijera (Nelson i Cox 2008). Interakcije između molekule i enzima smanjuju energiju aktivacije te na taj način ubrzavaju kemijsku reakciju. Stoga, kako bi se u aktivnom mjestu katalitičkog antitijela formirala oksianionska udubina, potrebno je kao hapten koristiti molekulu negativnog naboja.

Kao najprikladniji analozi tetraedarskog intermedijera pokazali su se spojevi koji u svojoj strukturi sadrže fosfor (Blackburn i Garçon 2000). Prvi uvjet – stabilnost haptena – je upotrebom takvog analoga zadovoljen jer fosfati i fosfonati formiraju stabilnu tetraedarsku strukturu. Negativni naboj potječe iz visoko polarizirane P=O veze – elektronegativniji kisik (*EN* = 3.5) jače privlači elektrone od fosfora (*EN* = 2.1), pri čemu dolazi do premještanja negativnog naboja bliže atomu kisika (Silberberg 2009). P=O veza ima još jednu prednost: duljinom od 1.521 Å bliža je duljini C···O veze prjelaznog stanja (oko 2.1 Å) od kraće $C–O^-$ veze tetraedarskog intermedijera (oko 1.3 Å) (Teraishi *i sur.* 1994).

Jedan od tipičnih predstavnika ovakve katalize je 48G7, antitijelo komplementarno haptenu *p*-nitrofenilfosfonatu koje ubrzava hidrolizu određenih estera $1.6 \cdot 10^4$, a karbonata 4

· 10^4 puta (Hilvert 2005). Kataliza 48G7 antitijela relativno je jednostavna i temelji se na nukleofilnom napadu hidroksida na karbonilni ugljik supstrata (sl. 3a). Kristalna struktura antitijela sa i bez vezanog haptena otkriva posebnosti aktivnog mjesta koje doprinose uspješnoj katalizi (Wedemayer *i sur.* 1997). Kao što je prikazano na slici 3b, dva atoma kisika u haptenu (**1**) rezonancijom dijele negativni naboj te su stoga oba stabilizirana nekovalentnim interakcijama s aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima. Jedan fosfonilni kisik je stabiliziran bočnim ograncima tirozina (Tyr^{H33}) i arginina (Arg^{L96}), dok drugi ostvaruje vodikove veze s bočnim ogrankom histidina (His^{H35}) i amidnom skupinom tirozina (Tyr^{H96}) peptidne okosnice (Hilvert 2005). Međutim, pojedinačne aminokiseline u 48G7 nisu dobri stabilizatori oksianiona tetraedarskog intermedijera, što pokazuje smanjenje k_{cat} samo 3 do 30 puta u slučaju mutacija na pozicijama H33, H35 i L96. U usporedbi, uklanjanje samo jednog asparagina iz oksianionske udubine proteaze subtilizina uzrokuje smanjenje k_{cat} čak 10^2 – 10^3 puta (Hilvert 2005).



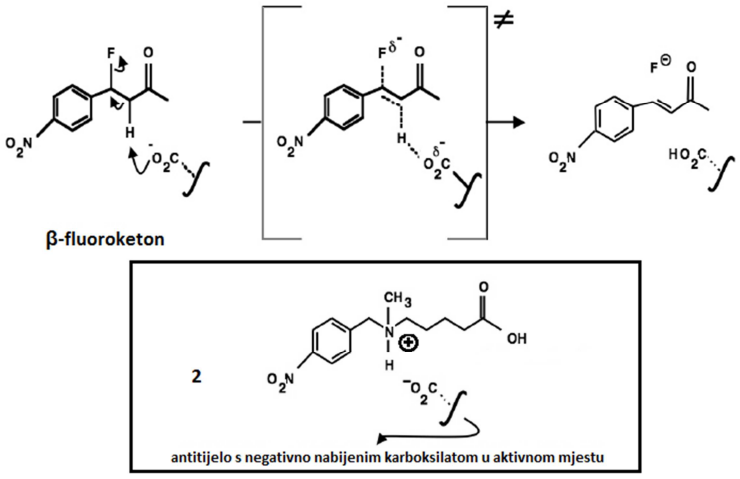
Slika 3. a) Hidroliza arilnog estera katalizirana 48G7 antitijelom. **b)** Prikaz aktivnog mjesta 46G7 antitijela s vezanim haptenom. Istaknute su aminokiseline koje stabiliziraju prijelazno stanje. Preuzeto i prilagođeno iz Hilvert (2005).

4.2. Metoda mamca i zamjene

Drugačiji pristup stvaranju pogodnih haptenskih molekula u odnosu na dizajniranje analoga prijelaznih stanja predstavlja metoda mamca i zamjene (prema engl. *bait and switch*). Dobra trodimenzionalna struktura haptena bitna je jer osigurava da prijelazno stanje pristaje u udubinu aktivnog mjesta antitijela, ali za uspješnu katalizu sama po sebi nije dovoljna. Kao

što je već prikazano na primjeru oksianionske udubine u hidrolitičkim reakcijama, pravilan raspored naboja u aktivnom mjestu antitijela ključan je za stabilizaciju prijelaznog stanja i posljedično smanjenje energije aktivacije. Kao „mamac“ koristi se hapten – modificirani supstrat koji sadrži nabijene skupine raspoređene tako da imitiraju pretpostavljeni obrazac naboja prijelaznog stanja. Korištenjem takvog haptena kao antigena očekuje se nastanak antitijela koje u svom aktivnom mjestu ima aminokiseline sposobne stabilizirati naboj antigena – a s njime i prijelazno stanje željene reakcije. Pretraživanje populacije antitijela kako bi se pronašla ona s katalitičkom funkcijom uključuje „zamjenu“ haptena za supstrat i detekciju produkta kemijske reakcije (Blackburn i Garçon 2000).

Prvi uspjeh u proizvodnji katalitičkih antitijela metodom mamca i zamjene zabilježili su Shokat *i sur.* (1989) kada su upotrebom pozitivno nabijenog haptena (**2**) uspjeli proizvesti antitijelo 43D4-3D12 koje je kataliziralo reakciju β-eliminacije – uspješnu eliminaciju HF iz molekule β-fluoroketona pri čemu je kao produkt dobiven α,β-nezasićeni keton (sl. 4). Izdvajanje protona iz molekule supstrata u reakcijama eliminacije obično je rezultat prisustva karboksilata, bočnih lanaca aspartata ili glutamata, u aktivnom mjestu enzima. Kasnijim istraživanjima doista je potvrđena prisutnost glutamata (Glu^{46H}) u aktivnom mjestu antitijela (Shokat *i sur.* 1994). Dakle, korištenjem pozitivno nabijenog haptena potaknuto je stvaranje antitijela s negativno nabijenom aminokiselinom u aktivnom mjestu koja je imala središnju ulogu u katalizi reakcije β-eliminacije.



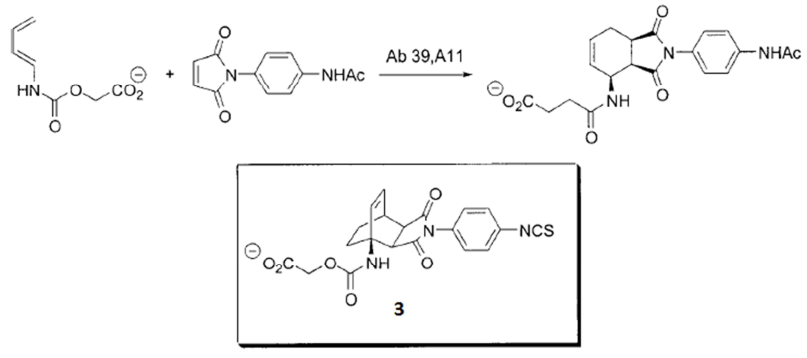
Slika 4. Eliminacija flourovodika iz β-fluoroketona katalizirana 43D4-3D12 antitijelom. Preuzeto i prilagođeno iz Rao i Wootla (2007).

4.3. Entropijske zamke

Prilikom dizajniranja haptena, ne smije se zaboraviti važnost kontrole translacijske i rotacijske entropije prijelaznog stanja u aktivnom mjestu enzima (Blackburn i Garçon 2000). Najvažnije funkcije antitijela koja djeluju kao entropijske zamke (engl. *entropic traps*) su

zarobljavanje dva supstrata u aktivnom mjestu, održavanje optimalne udaljenosti i orijentacije supstrata za reakciju te efikasno otpuštanje produkta iz aktivnog mjesta nakon dovršene kemijske reakcije (Tremblay *i sur.* 2001). Prednost pravilno orijentiranih i blisko postavljenih supstrata u odnosu na slobodne supstrate u otopini je jasna: vjerojatnost da se dva supstrata u otopini sudare u pravilnoj orijentaciji te da sudar bude dovoljno jak za prijelaz preko energetske barijere reakcije je malena. Uspostavljanjem višestrukih nekovalentnih interakcija enzim može vezati molekule supstrata u povoljnoj prostornoj orijentaciji i na odgovarajućoj udaljenosti te na taj način osigurati povećanje brzine reakcije za nekoliko redova veličina (Nelson i Cox 2008). Inhibicija produktom može predstavljati problem ako su prijelazno stanje i produkt reakcije vrlo slični - produkt ostaje vezan snažnim interakcijama za enzim što sprječava vezanje novih supstrata u aktivno mjesto.

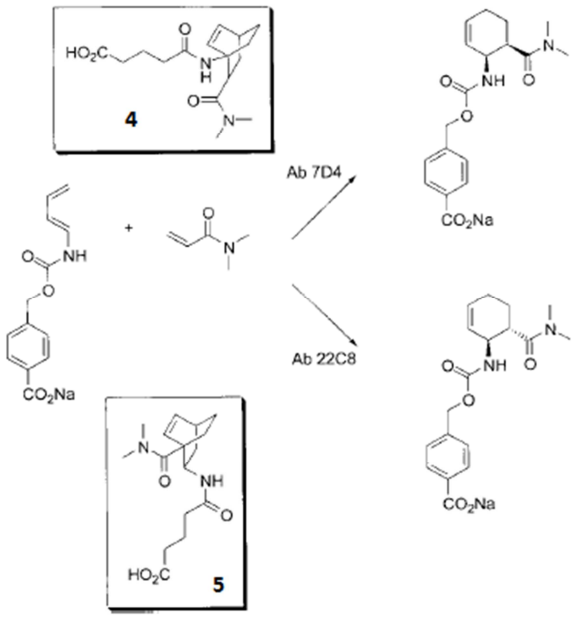
Antitijela kao entropijske zamke dobivaju posebno veliku važnost u reakcijama cikloadicija, posebno u Diels-Alder reakcijama gdje dieni i alkeni (često nazivani dienofili) daju cikloheksenski produkt (Rao i Wootla 2007). Važnost ovih reakcija leži u dobivanju širokog spektra cikličkih produkata visoke regio- i stereoselektivnosti u blagim reakcijskim uvjetima (Ose *i sur.* 2003). Međutim, prirodni enzimi koji kataliziraju Diels-Alder reakcije su malobrojni i do nedavno smatrani nepostojećima – solanapiron-sintaza i makrofomat-sintaza su jedne od rijetkih Diels-Alderaza dobivenih iz prirode (Katayama *i sur.* 1998, Oikawa *i sur.* 1999). Diels-Alder reakcije pripadaju skupini pericikličkih reakcija – usklađenih reakcija s prijelaznim stanjem cikličke geometrije. Orbitale prijelaznog stanja strogo su raspoređene, što kao posljedicu ima visoku entropiju aktivacije ($\Delta S^{\ddagger}$) koja se kreće u vrijednostima između -125 i -170 J K^{-1} mol^{-1} (Schultz i Lerner 1995). Potreba za enzimima koji kataliziraju takve reakcije rodila je ideju o upotrebi katalitičkih antitijela za katalizu procesa koji se rijetko ili nikada ne događaju u prirodi.



Slika 5. Diels-Alder reakcija katalizirana 39, A11 antitijelom. Preuzeto i prilagođeno iz Tremblay *i sur.* (2001).

Jedan od uobičajenih primjera katalize Diels-Alder reakcije predstavlja adicija acikličkog diena *N*-fenilmaleimidu, pri čemu nastaje cikloheksenski produkt (sl. 5) (Braisted i Schultz 1990). Za proizvodnju katalitičkog antitijela 39, A11 korišten je hapten (**3**) baziran na biciklo[2.2.2]oktenu s dodanim hidrofobnim etano mostom. Most strukturno nije dio prijelaznog stanja, ali je dodan haptenu kako bi fiksirao cikloheksenski prsten u visoko organiziranu i rigidnu *endo* konformaciju koja se pojavljuje u prijelaznom stanju. Činjenica da etano most ne postoji kod produkta reakcije predstavlja još jednu prednost – aktivno mjesto antitijela slabije veže nastali cikloheksen, što minimizira inhibiciju produktom te čini proizvedeno antitijelo učinkovitijim katalizatorom (Schultz i Lerner 1995).

Gouverneur *i sur*. (1993) uspješno su proizveli katalitička antitijela koja kataliziraju Diels-Alder reakciju s visokim stupnjem enantioselektivnosti (sl. 6). Cikloadicija *trans*-1-*N*-acilamino-1,3-butadiena na *N*,*N*-dimetilakrilamid u nekataliziranim uvjetima daje smjesu *endo* i *exo* produkta u odnosu 85:15. Međutim, korištenjem konstruiranih antitijela za katalizu postigla se impresivna enantioselektivnost reakcije veća od 98% (Tremblay *i sur*. 2001). Kao analog prijelaznog stanja ponovno je korišten biciklo[2.2.2]okten – za dobivanje antitijela koje daje *endo* produkte amido skupina alkena okrenuta je prema π orbitalama diena (**4**), dok je za dobivanje *exo* produkta korišten hapten (**5**) s amido skupinom okrenutom od istih π orbitala (Schultz i Lerner 1995).



Slika 6. Diels-Alder reakcija cikloadicije trans-1-N-acilamino-1,3-butadiena na N,N-dimetilakrilamid pri čemu nastaje *exo* ili *endo* produkt. Antitijela 7D4 i 22C8 imaju visoku stereoselektivnost. Preuzeto i prilagođeno iz Tremblay *i sur*. (2001).

4.4. Desolvatacija supstrata

Prelazak supstrata iz vodenog medija u hidrofobnu okolinu u nekim slučajevima može biti snažan pokretač kemijske reakcije. Supstrati koji su u vodenoj otopini stabilizirani vodikovim vezama mogu prelaskom u manje polarnu okolinu postati nestabilni. Nestabilnost supstrata u aktivnom mjestu preferentno se rješava prelaskom molekule u formu prijelaznog

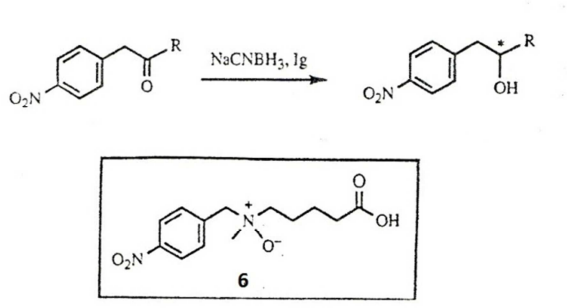
stanja stabiliziranog interakcijama s aktivnim mjestom enzima (Blackburn i Garçon 2000). Ubrzanje reakcija ovakvog tipa često je vrlo veliko i ograničeno jedino količinom vezne energije potrebne za prisiljavanje supstrata u destabilizirajuću sredinu (Hilvert 2005).

Klasičan primjer ubrzanja kemijske reakcije izazvan desolvatacijom supstrata je Kempova dekarboksilacija 6-nitro-3-karboksibenzisoksazola (Kemp 1970). Anioni karboksilne kiseline nestabilni su ako su okruženi otapalom s kojim ne mogu stvarati vodikove veze. Posljedica takve destabilizacije je 10^7 puta brža dekarboksilacija u usporedbi s reakcijom u vodenom mediju (Blackburn i Garçon 2000). Unatoč obećavajućim predviđanjima, dobivena antitijela za reakcije Kempove dekarboksilacije polučila su manji uspjeh od očekivanog – antitijelo s najboljim katalitičkim sposobnostima, 25E10, ubrzavalo je reakciju tek $2 \cdot 10^4$ puta (Lewis *i sur.* 1991).

5. Upotreba neobičnih kofaktora

Mnoge enzimatske reakcije proteinski dio enzima ne može sam katalizirati i one zahtijevaju dodatne kofaktore kao što su flavini, nikotinamidi, piridoksali ili metalni ioni. Osim kofaktora koji se pojavljuju kod prirodnih enzima, postoji niz drugih spojeva koji se mogu koristiti u laboratoriju za isti tip kemijskih reakcija. Manja cijena i jednostavnost uporabe takvih spojeva potaknuli su istraživanja usmjerena prema dizajnu antitijela koja ih mogu koristiti u katalizi u zamjenu za uobičajene enzimske kofaktore (Schultz i Lerner 1995).

Nakayama i Schultz (1992) kreirali su antitijelo sposobno katalizirati redukciju α-keto amida u α-hidroksi amid uz uporabu $NaBH_3CN$ umjesto uobičajenog NADH ili NADPH kofaktora (sl. 7). Korišteni hapten (**6**) oponašao je tetraedarsku strukturu prijelaznog stanja koja je posljedica nukleofilnog napada hidrida na karbonilni ugljik supstrata. Visok stupanj enantiospecifičnosti rezultat je kiralnog aktivnog mjesta antitijela koje je sposobno razlikovati različite strane prokiralnog supstrata (Schultz i Lerner 1995).



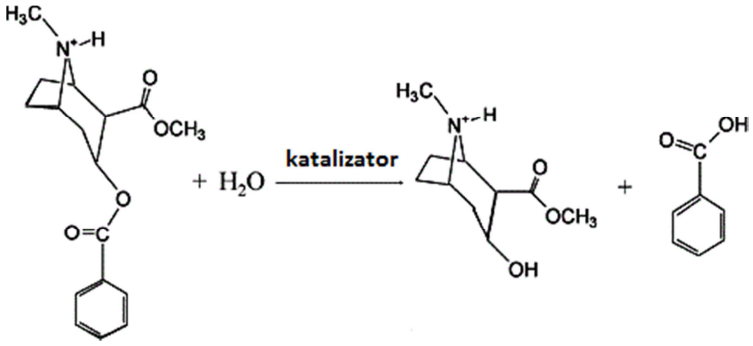
Slika 7. Antitijelom katalizirana redukcija ketona u alkohol uz $NaBH_3CN$ kofaktor. Preuzeto i prilagođeno iz Schultz i Lerner (1995).

6. Katalitička antitijela kao terapeutici

Mogućnosti upotrebe katalitičkih antitijela u medicini su goleme i, nažalost, tek na začetku. Korištenje abzima u aktivaciji antitumorskih lijekova već je danas u širokoj upotrebi, dok su cjepiva koja se baziraju na anti-kokainskim antitijelima u uznapredovaloj fazi istraživanja. Uz to, abzimi bi se mogli pokazati kao vrlo korisni terapeutici u detoksifikaciji, u uništavanju mikroorganizama i virusa, kao ublaživači simtoma genetskih oboljenja ili čak kao korisno sredstvo u borbi protiv debljine (Ali *i sur.* 2008).

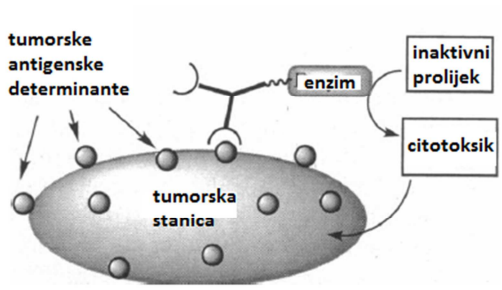
6.1. Anti-kokainska antitijela

Trenutno najaktualnija medicinska istraživanja koja koriste katalitička antitijela u terapeutske svrhe vezana su uz „anti-kokainska cjepiva“. Dva glavna pristupa čine temelj ovih istraživanja: pasivna imunizacija već proizvedenim katalitičkim antitijelima (Norman *i sur.* 2014) i poticanje stvaranja prirodnih abzima u krvotoku pacijenta ubrizgavanjem haptena norkokaina (Orson *i sur.* 2013). U oba slučaja, nastala katalitička antitijela sposobna su hidrolizirati kokain u benzoilecgonin i ecgonin-metilni ester (sl. 8), produkte bez toksičnog i opojnog djelovanja (Rao i Wootla 2007). Ubrizgavanjem gotovih antitijela dolazi do brze razgradnje kokaina i oslobađanja kokainskih receptora, što je osobito bitno u slučajevima predoziranja. Prirodna katalitička antitijela imaju sporije djelovanje, ali mogu biti osobito korisna u slučajevima kronične ovisnosti. Klinička istraživanja učinkovitosti ovakvih cjepiva na ljudskim i životinjskim modelima su u tijeku, te iako su dobiveni rezultati obećavajući, glavna kritika proizlazi iz činjenice da se potpuna razgradnja kokaina može zaobići uzimanjem većih doza droge. Također, razina antitijela u krvotoku drastično pada dva mjeseca nakon imunizacije te je stoga potrebno učestalo cijepljenje kako bi se razina anti-kokainskih antitijela u organizmu održala stalnom (Hall i Carter 2004).



Slika 8. Reakcija hidrolize kokaina. Preuzeto i prilagođeno iz Zhan (2006).

6.2. Aktivacija prolijekova



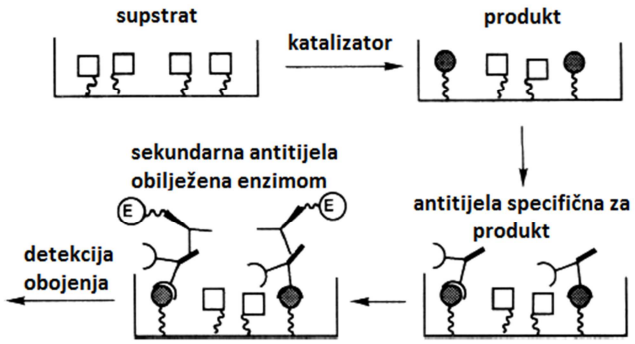
Slika 9. Shematski prikaz ADEPT-a. Preuzeto i prilagođeno iz Wentworth *i sur.* (1995).

Unatoč širokom spektru dostupnih kemoterapeutika različitih djelovanja i specifičnosti, idealni lijek protiv tumora i dalje ostaje neotkriven. Velika sličnost između tumorskih i netumorskih stanica predstavlja glavni problem u selektivnom uništavanju zloćudnih stanica. Iako je potraga za svojstvom karakterističnim samo za tumorske stanice ponudila brojna rješenja, nijedno od njih nije u potpunosti eliminiralo problem štetnih nuspojava koje se javljaju kada antitumorski lijekovi oštete i netumorske stanice. Potreba za selektivnijim lijekovima i smanjenom perifernom citotoksičnošću te otkriće antigenskih determinanti specifičnih samo za tumorske stanice urodila je razvojem ADEPT-a (engl. *antibody-directed enzyme prodrug therapy*). Tretman se sastoji od dva koraka. Prvo se u organizam unosi enzim konjugiran na antitijelo specifično za tumorske antigenske determinante, a nakon što se konjugat veže za tumorske stanice, slijedi unos prolijeka (sl. 9). Kemoterapeutik postaje aktiviran tek nakon što ga katalizira enzim pričvršćen za tumorsku stanicu, što znači da aktivirani lijek djeluje samo u neposrednoj blizini ciljane stanice. Takva lokalizacija antitumorskog terapeutika osigurava veću efikasnost uništavanja zloćudnih stanica i njegovu smanjenu perifernu citotoksičnost (Wentworth *i sur.* 1995). Međutim, jedno od glavnih ograničenja ovakvog tretmana je imunogeničnost enzim-antitijelo konjugata. Naime, kako je većina lijekova korištenih u kemoterapeutici bakterijskog porijekla, obično se koriste i bakterijski enzimi da bi se očuvala specifičnost reakcije (Ali *i sur.* 2008). Takve bakterijske enzime organizam prepoznaje kao stranu tvar te stoga protiv njih pokreće neželjeni imunološki odgovor. Rješenje problema ponudila su katalitička antitijela u obliku ADAPT-a (engl. *antibody-directed abzyme prodrug therapy*). Umjesto bakterijskih enzima, kao aktivatori prolijekova koriste se visoko specifična humanizirana katalitička antitijela koja ne izazivaju imunološki odgovor u ljudskom organizmu (Wentworth *i sur.* 1995). Satchi-Fainaro *i sur.* (2002) dizajnirali su antitijelo 38C2 HPMA-kopolimer konjugat koje sadrži dva različita vezna mjesta – jedno se s velikom specifičnošću veže za antigenske determinante tumorskih stanica, dok drugo katalizira aktivaciju prolijeka. ADAPT

se trenutno koristi uz tradicionalne kemoterapeutike, a sve više dobiva na važnosti i kao samostalan antitumorski tretman.

7. Produkcija katalitičkih antitijela

Dobivanje katalitičkih antitijela često je mukotrpan i vrlo dugotrajan proces koji zahtijeva znanje kemije, imunologije, biokemije i molekularne biologije. Detaljno poznavanje tijeka kemijske reakcije ključno je za dizajniranje prikladnih haptena, no Blackburn i Garçon (2000) naglašavaju kako je proces usprkos svemu u većini slučajeva neuspješan. Uobičajeno je da se za imunizaciju haptenima vezanima na nosače koriste miševi stari 8-12 tjedana. Nakon što je utvrđeno da je titar antitijela u krvi dovoljno visok, iz životinje se izdvajaju splenociti i fuzioniraju s mijeloma stanicama, što rezultira nastankom hibridoma stanica - besmrtne stanične linije koja je sposobna proizvoditi antitijela. Oko 600-900 hibridoma stanica se zatim pretražuje za specifična antitijela koja potencijalno imaju katalitičku aktivnost (Kubitz i Keinan 2005). Postoje dva uobičajena pristupa za pretraživanje uzoraka na prisutnost specifičnih antitijela: pomoću jednog se detektiraju sva antitijela koja se vežu za hapten, dok drugi otkriva katalitičku aktivnost antitijela u uzorku. Za prvi pristup koristi se ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) s molekulama haptena pričvršćenima za podlogu. Drugi pristup značajno je bolji, ali ujedno i skuplji jer catElisa (engl. *catalytic ELISA*) zahtijeva antitijela specifična za produkt reakcije (sl. 10). Za podlogu se veže supstrat koji se izlaže djelovanju antitijela dobivenih iz hibridoma stanica, a zatim se pomoću drugog seta antitijela detektira je li došlo do nastanka produkta reakcije (Tawfik *i sur.* 1993). Ako je rezultat testa pozitivan, hibridoma stanice se izdvajaju, subkultiviraju i koriste za masovnu proizvodnju monoklonskih katalitičkih antitijela.



Slika 10. Shematski prikaz catELISA-e. Preuzeto i prilagođeno iz Tawfik *i sur.* (1993).

Pročišćenim abzimima biokemijskim se metodama određuje kinetika katalizirane kemijske rekacije i specifičnost, nakon čega slijedi kristalizacija i određivanje točne strukture aktivnog mjesta antitijela korištenjem difrakcije X-zraka. Napokon, metodama molekularne

biologije, najčešće ciljanom mutagenezom, mogu se poboljšati katalitička svojstva dobivenog enzima (Blackburn i Garçon 2000).

8. Ograničenja i budućnost

Kao najbolji parametar za određivanje katalitičke efikasnosti enzima koristi se konstanta specifičnosti, k_{cat}/K_m, mjera brzine katalizirane transformacije supstrata u produkt (Nelson i Cox 2008). Kinetički „savršeni" enzimi dostižu k_{cat}/K_m u vrijednosti između 10^8 i 10^9 M^{-1} s^{-1}, dok konstante specifičnosti prosječnih enzima iznose oko 10^5 M^{-1} s^{-1} (Bar-Even *i sur*. 2011). Međutim, najbolja katalitička antitijela imaju katalitičku efikasnost manju i od prosječnih enzima: vrijednosti k_{cat}/K_m kreću se u vrijednostima tek oko 10^2 i 10^4 M^{-1} s^{-1} (Hilvert 2005). Jasno je da ovakve skromne katalitičke sposobnosti abzima predstavljaju veliko ograničenje u njihovoj praktičnoj primjeni te ih je neophodno poboljšati kako bi veliki troškovi i dugotrajnost njihove proizvodnje bili opravdani.

Kao još jedno ograničenje katalitičkih antitijela spominje se, iznenađujuće, njihova velika specifičnost. Naime, iako se ona često navodi kao poželjna karakteristika enzima, predstavlja prepreku u primjeni katalitičkih antitijela na području organske sinteze. Velika specifičnost zahtijeva poseban oblik katalizatora za svaki različiti supstrat, dok bi poželjnija bila mogućnost katalize kemijske reakcije neovisno o strukturi koja okružuje reakcijski entar (Schultz i Lerner 1995).

Dostupnost i troškovi proizvodnje ostaju velik problem u produkciji katalitičkih antitijela, što se u nekim slučajevima rješava sustavima prekomjerne ekspresije u modelima kvasaca, bakterija i biljaka (Schultz i Lerner 1995). Napokon, postavlja se pitanje mogu li katalitička antitijela oponašati kompleksnija svojstva prirodnih enzima kao što je primjerice alosterička aktivacija.

Unatoč golemim mogućnostima primjene katalitičkih antitijela u najrazličitijim područjima biokemije, organske kemije, biotehnologije ili medicine, znanstvena zajednica je s vremenom izgubila interes za abzime. Velika predviđanja o revoluciji u znanosti koju bi donijela katalitička antitijela većinom su ostala neostvarena – veliki troškovi, dugotrajnost proizvodnje te nezadovoljavajuće katalitičke performanse predstavljale su preveliku prepreku za daljnji razvoj ove tehnologije. Međutim, prilika za njeno oživljavanje pojavljuje se na području medicine gdje se katalitička antitijela sporo ali postojano integriraju kao terapeutici u liječenju tumora i ovisnosti. Iako je teško predvidjeti hoće li budućnost donijeti ponovni

procvat tehnologije katalitičkih antitijela, jasno je da abzimi otvaraju nebrojene mogućnosti za primjenu i poboljšanje svih grana znanstvenih istraživanja i biotehnologije.

9. Literatura

Ali M, Hariharan AG, Mishra N, Jain S (2008) Catalytic antibodies as potential therapeutics. *Indian Journal of Biotechnology,* **8**: 253 – 258.

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2010) *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, pp. 58 – 97, 144 – 155.

Bar-Even A, Noor E, Savir Y, Liebermeister W, Davidi D, Tawfik DS, Milo R (2011) The moderately efficient enzyme: Evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry,* **50**: 4402 – 4410.

Blackburn GM, Garçon A (2000) Catalytic Antibodies. In: Rehm HJ, Reed G, eds. (2000) *Biotechnology: Biotransformations II, Volume 8b*, 2nd edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Braisted AC, Schultz PG (1990) An antibody-catalyzed bimolecular Diels-Alder reaction. *Journal of the American Chemical Society,* **112**: 7430 – 7431.

Breslow R (2005) *Artificial Enzymes*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Fischer E (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27: 2985 – 2993.

Gearhart PJ (2006) Antibody wars: Extreme diversity. *The Journal of Immunology* **177**: 4235 – 4236.

Gouverneur VE, Houk KN, de Pascual-Teresa B, Beno B, Janda KD, Lerner RA (1993) Control of the exo and endo pathways of the Diels-Alder reaction by antibody catalysis. *Science* **262**: 204 – 208.

Hall W, Carter L (2004) Ethical issues in using a cocaine vaccine to treat and prevent cocaine abuse and dependence. *Journal of Medical Ethics*, **30**: 337 – 340.

Hammond GS (1955) A correlation of reaction Rates. *Journal of the American Chemical Society*, **77**: 334 – 338.

Hilvert D (2005) Critical analysis of antibody catalysis. In: Keinan E, ed. (2005) Catalytic Antibodies. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Jencks WP (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York: Dover Publications, p. 288.

Katayama K, Kobayashi T, Oikawa H, Honma M, Ichihara A (1998) Enzymatic activity and partial purification of solanapyrone synthase: first enzyme catalyzing Diels-Alder reaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1384**: 387 – 395.

Kemp DS (1970) Decarboxylation of benzisoxazole-3-carboxylic acids. Catalysis by extraction of possible relevance to the problem of enzymatic mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, **92**: 2553 – 2554.

Kubitz D, Keinan E (2005) Production of monoclonal catalytic antibodies: principles and practice. In: Keinan E, ed. (2005) *Catalytic Antibodies*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Lewis C, Krämer T, Robinson S, Hilvert D (1991) Medium effects in antibody-catalyzed reactions. *Science*, **253**: 1019 – 1022.

Nakayama GR, Schultz PG (1992) Stereospecific antibody-catalyzed reduction of an α-keto amide. *Journal of the American Chemical Society*, **114**: 780 – 781.

Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th edition. New York: W. H. Freeman and Company, pp. 170 – 174, 183 – 232.

Norman AB, Gllden FCT, Tabet MR, Ball WJ (2014) A recombinant humanized anti-cocaine monoclonal antibody inhibits the distribution of cocaine to the brain in rats. *Drug Metabolism & Disposition*, **42**: 1125 – 1131.

Oikawa H, Watanabe K, Yagi K, Ohashi S, Mie T, Ichihara A, Honma M (1999) Macrophomate synthase: Unusual enzyme catalyzing multiple reactions from pyrones to benzoates. *Tetrahedron letters*, **40**: 6983 – 6986.

Orson FM, Rossen RD, Shen X, Lopez AY, Wu Y, Kosten TR (2013) Spontaneous development of IgM anti-cocaine antibodies in habitual cocaine users: Effect on IgG antibody responses to a cocaine cholera toxin B conjugate vaccine. *The American Journal of Addictions*, **22**: 169 – 174.

Ose T, Watanabe K, Mie T, Honma M, Watanabe H, Yao M, Oikawa H, Tanaka I (2003) Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase. *Nature*, **422**: 185 – 189.

Pauling L (1948) Nature of forces between large molecules of biological interest. *Nature*, **161**: 707 – 709.

Polgar L, Bender ML (1966) A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *Journal of the American Chemical Society*, **88**: 3153 – 3154.

Pollack SJ, Jacobs JW, Schultz PG (1986) Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*, **234**: 1570 - 1573.

Rao DN, Wootla B (2007) Catalytic antibodies: Concept and promise. *Resonance* **12**: 6 – 21.

Satchi-Fainaro R, Wrasidlo W, Lode HN, Shabat D (2002) Synthesis and characterization of a catalytic antibody-HPMA copolymer-Conjugate as a tool for tumor selective prodrug activation. *Bioorganic & Medical Chemistry*, **10**: 3023 – 3029.

Schultz PG, Lerner RA (1995) From molecular diversity to catalysis: Lessons from the immune system. *Science*, **269**: 1835 – 1842.

Shokat K, Uno T, Schultz PG (1994) Mechanistic studies of an antibody-catalyzed elimination reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **116**: 2261 – 2270.

Shokat K, Leumann CJ, Sugasawara R, Schultz PG (1989) A new strategy for the generation of catalytic antibodies. *Nature*, **338**: 269 – 271.

Silberberg MS (2009) Chemistry: *The Molecular Nature of Matter and Change*, 5th edition. New York: McGraw-Hill, pp. 363 – 369.

Slobin LI (1966) Preparation and some properties of antibodies with specificity toward *p*-nitrophenyl esters. *Biochemistry*, **5**: 2836 – 2844.

Tawfik DS, Green BS, Chap R, Sela M, Eshhar Z (1993) catELISA: A facile general route to catalytic antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**: 373 – 377.

Teraishi K, Saito M, Fuj I, Nakamura H (1994) Design of the hapten for the induction of antibodies catalysing aldol reaction. *Journal of Molecular Graphics*, **12**: 262 - 265.

Tramontano A, Janda KD, Lerner RA (1986) Catalytic antibodies. *Science* **234**: 1566 - 1570.

Tremblay MR, Dickerson TJ, Janda KD (2001) Advances in antibody catalysis of cycloaddition reactions. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **343**: 577 – 585.

Wedemayer GJ, Wang LH, Patten PA, Schultz PG, Stevens RC (1997) Crystal structures of the free and liganded form of an esterolytic catalytic antibody. *Journal of Molecular Biology*, **268**: 390 – 400.

Wentworth P, Datta A, Blakey D, Boyle T, Partridge LY, Blackburn GM (1995) Toward antibody-directed "abzyme" prodrug therapy, ADAPT: Carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its in vitro application to human tumor cell killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**: 799 – 803.

Yin J, Schultz PG (2005) Immunological Evolution of Catalysis. In: Keinan E, ed. (2005) *Catalytic Antibodies*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Zhan CG (2006) Modeling Reaction Mechanism of Cocaine Hydrolysis and Rational Drug Design for Therapeutic Treatment of Cocaine Abuse. In: Gupta SP, ed. (2006) *QSAR and Molecular Modeling Studies in Heterocyclic Drugs II*. New York: Springer.

10. Sažetak

Katalitička antitijela ili abzimi su imunoglobulini s vlastitom katalitičkom aktivnošću. Kako bi se dobila antitijela sa svojstvima katalizatora, kao imunogeni koriste se hapteni koji nalikuju na prijelazno stanje željene reakcije. Katalitička antitijela mogu se dizajnirati za širok spektar kemijskih transformacija i uključuju katalizatore koji pokazuju visok stupanj stereoselektivnosti, one koje koriste nekonvencionalne kofaktore te antitijela koja kataliziraju procese za koje ne postoje prirodni enzimi. Unatoč velikim mogućnostima njihove primjene na području biokemije, organske kemije, biotehnologije ili medicine, visoki troškovi, dugotrajnost postupka proizvodnje i slabija katalitička efikasnost predstavljaju veliku prepreku za njihov daljnji razvoj. Nova perspektiva za katalitička antitijela pojavljuje se na području medicine gdje se abzimi koriste kao terapeutici u detoksifikaciji i liječenju tumora.

11. Summary

Catalytic antibodies or abzymes are immunoglobulins with intrinsic catalytic properties. In order to obtain such antibodies, haptens which resemble the transition state of a given reaction are used as immunogens. Catalytic antibodies can be generated for a wide spectrum of chemical transformations – they include catalysts which show great level of stereoselectivity, those which utilize unusual cofactors, as well as antibodies that are able to catalyze reactions for which natural enzymes have yet to be found. Applications of antibody catalysis in biochemistry, organic chemistry, biotechnology and medicine are numerous, however, high costs, slow production and modest catalytic efficiency pose great limitations in further advancement of this technology. New perspective for catalytic antibodies arises from the field of medicine as they are being used as therapeutics in detoxification and cancer treatment.