

Katalytische Antikörper: eine neue Klasse von Übergangszustands-Analoga zur Erzeugung hydrolytischer Antikörper**

Von Kevan M. Shokat, Marcia K. Ko, Thomas S. Scanlan, Lynn Kochersperger, Shirlee Yonkovich, Suvit Thaisrivong und Peter G. Schultz*

Design und Herstellung von selektiven Katalysatoren sind wichtige Ziele von Chemikern und Biologen. Für die Katalysatorenentwicklung gibt es eine Reihe von neueren Strategien, wie die Derivatisierung von synthetischen Wirtverbindungen, die chemische Modifikation und die ortsspezifische Mutagenese von Enzymen sowie die Beeinflussung der natürlichen Enzymaktivitäten durch organische Lösungsmittel. Seit 1986 nutzen mehrere Laboratorien das Immunsystem, um selektive Antikörper-Katalysatoren zu erzeugen, die eine breite Palette von chemischen Transformationen katalysieren können. Dazu gehören zum Beispiel Acyltransfer-Reaktionen, β -Eliminierungen, C,C-Verknüpfungen, C,C-Spaltungen, Porphyrin-katalysierte Metallierungen, Peroxidierungen und Redoxreaktionen. Bandbreite und Zahl der Transformationen, die während dieser kurzen Zeit durch Antikörper katalysiert werden konnten, belegen die vielfältigen Möglichkeiten dieser Technik zur Erzeugung selektiver Katalysatoren für die Anwendung in Chemie, Biologie und Medizin. Wir berichten hier über den Einsatz einer neuen Klasse von ungeladenen Übergangszustands-Analoga zur Erzeugung von Antikörpern, die die Hydrolyse von Estern und Carbonaten katalysieren, sowie über einen Vergleich dieser Antikörper mit Antikörpern gegen Analoga von tetraedrisch konfigurierten Phosphat- und Phosphonat-Übergangszustands-Analoga.

1. Einführung

Das Immunsystem hat das Potential zur Erzeugung von 10^{11} verschiedenen Antikörpern^[1]. Dieses Maß an Diversität zu erzeugen und Moleküle mit den gewünschten biologischen Eigenschaften aus diesem enormen Repertoire auszuwählen, ist einzig mit biologischen Systemen möglich. Die Leichtigkeit, mit der ein ganzes Sortiment von Antikörpern mit der gewünschten Bindungsspezifität und Affinität für einen bestimmten Liganden produziert werden kann, zeigt klar die Vorteile dieses Ansatzes zur Erzeugung „maßgeschneiderter“ Proteine. Das Immunsystem generiert und überprüft diese riesige Kollektion von Antikörpern durch den Mechanismus der klonalen Selektion. Jedes Antikörpermolekül des primären immunologischen Repertoires wird in die Zelloberfläche von Lymphocyten eingelagert. Wenn ein Lymphocyt mit einem bestimmten Antikörper auf der Oberfläche auf das entsprechende Antigen trifft, teilt und differenziert sich die Zelle und beginnt, lösliche Antikörpermoleküle zu produzieren. Gleichzeitig läuft in den Genen, die für die Antikörperbindungsstelle codieren, eine Veränderung ab, die zu einer Erhöhung der Affinität zum Hapten führt. Antikörper können sowohl gegen nahezu jedes Biopolymer als auch gegen kleine synthetische oder natürlich vorkommende Moleküle erzeugt werden. Aus der Möglichkeit, eine

Bindungsstelle für nahezu jedes potentielle Substrat erzeugen zu können, entstand die Herausforderung, Strategien zur Einführung von katalytischen Aktivitäten in diese Makromoleküle zu entwickeln. Enzyme nutzen mehrere Strategien zur Katalyse von Reaktionen, wie die Stabilisierung von Übergangszuständen, allgemeine Säure-Base-Katalyse sowie die Nutzung von Cofaktoren und Nachbarschaftseffekten. Jede dieser Strategien wurde schon erfolgreich zur Erzeugung von katalytischen Antikörpern angewendet und mehrere Übersichtsartikel über Design und Charakterisierung katalytischer Antikörper sind erschienen^[2-5].

Die ersten Beispiele für Antikörper-katalysierte Reaktionen basierten auf dem Konzept der Stabilisierung von Übergangszuständen. Vor über zwanzig Jahren schlug Jencks als erster vor, daß Antikörper gegen Analoga von Übergangszuständen den Übergangszustand besser als das Substrat binden und die Reaktion katalysieren sollten (Abb. 1)^[6]. Tat-

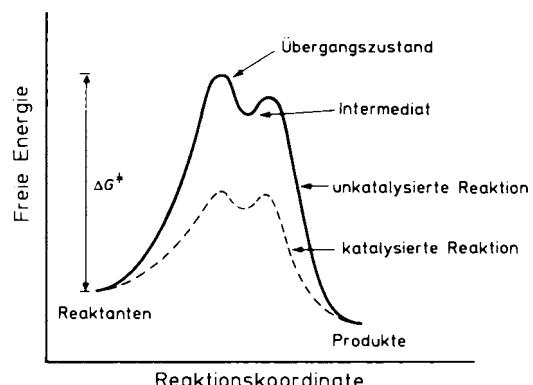


Abb. 1. Verlauf einer Antikörper-katalysierten und einer unkatalysierten Reaktion.

sächlich haben viele Enzyme ein aktives Zentrum, das sterisch und elektronisch komplementär zum geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustand ist^[7, 8]. Die Aktivität

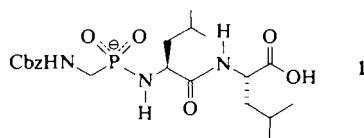
[*] Prof. P. G. Schultz, K. M. Shokat, M. K. Ko, Dr. T. S. Scanlan
Department of Chemistry, University of California
Berkeley, CA 94720 (USA)

Dr. S. Thaisrivong
Cardiovascular Diseases Research
The Upjohn Company

Dr. L. Kochersperger, S. Yonkovich
Department of Bioorganic Chemistry
Affymax Research Institute

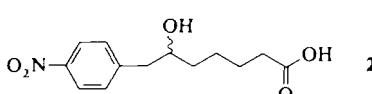
[**] Diese Arbeit wurde vom Office of Energy Research, Office General Life Sciences, Structural Biology Division des U.S. Department of Energy (DE-AC03-76SF00098) und der Damon-Ryan-Stiftung (T.S.S.) gefördert. Wir danken Dr. Jeff Jacobs für hilfreiche Diskussionen während der frühen Phasen des Projekts.

von hydrolytischen Enzymen wie der Zink-Peptidase Thermolysin beruht zumindest teilweise auf der selektiven Stabilisierung des negativ geladenen, tetraedrisch konfigurierten Intermediats der Peptid-Hydrolyse^[9]. Es wurde gezeigt, daß Übergangszustands-Analoga potente Enzyminhibitoren sind. Solche Übergangszustands-Analoga erreichen durch ihre Komplementarität zum aktiven Zentrum des Enzyms hohe Bindungsaffinitäten. Einer der stärksten Thermolysin-Inhibitoren ist das Phosphonat **1**, bei dem ein tetraedrisch konfiguriertes Phosphoratom das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats ersetzt^[9].



Da eine typische P-O-Einfachbindung 10–15% länger als eine C-O-Einfachbindung ist, sind diese Analoga der tetraedrischen Struktur des Übergangszustands sehr ähnlich, die längere, nur partiell ausgebildete Bindungen hat. Durch die Synthese einer Reihe von Analoga des Inhibitors **1** und der entsprechenden Substrate mit Substitutionen an der carboxyterminalen Aminosäure sowie der Messung der K_i - und K_M/k_{cat} -Werte wurde gezeigt, daß das Phosphonat **1** ein Inhibitor vom Typ der Übergangszustands-Analoga ist. Die K_i -Werte korrelierten nicht mit den K_M -Werten, sondern mit K_M/k_{cat} . Dies deutet darauf hin, daß die Faktoren, die die Bindung der Inhibitoren bestimmen, in ähnlicher Weise die Bindung des Übergangszustands in Relation zu der des Substrats beeinflussen.

Eine andere wichtige Klasse von Peptidase-Inhibitoren sind ungeladene, tetraedrische Analoga des Übergangszustands wie hydratisierte Ketone^[10] und Fluoroketone^[11] sowie sekundäre Alkohole^[12]. Dazu gehört Pepstatin, ein Inhibitor der Aspartat-Protease Pepsin^[13]. Die Schlüssel-funktion dieses Inhibitors ist die ungewöhnliche Aminosäure Statin, in der ein ungeladener sekundärer Alkohol die Carbonylfunktion der Amidbindung des Substrats ersetzt. In einer ähnlichen Analyse wie im Fall von Thermolysin wurden eine Reihe von K_i -Werten der Inhibitoren und K_M/k_{cat} -Werte der Substrate für Pepsin verglichen. Sie ergaben keine schlüssigen Ergebnisse, weil zwei Geschwindigkeitskonstanten in die gemessenen k_{cat} -Werte dieses Enzyms eingehen^[10]. Die Tatsache, daß die K_i -Werte von Pepstatin nicht mit den K_M - oder K_M/k_{cat} -Werten korrelieren, läßt vermuten, daß diese Inhibitoren nicht ausschließlich als Inhibitor vom Typ der Übergangszustands-Analoga oder als Multisubstrat-Inhibitor wirken. Statin-artige Strukturen ähneln zumindest teilweise dem tetraedrischen Übergangszustand bei der Hydrolyse einer Amidbindung. Daraus wurde geschlossen, daß ein Antikörper gegen einen Inhibitor vom Statin-Typ möglicherweise die Hydrolyse der korrespondierenden Ester oder Amide katalysieren könnte. Tatsächlich katalysieren Antikörper gegen den Alkohol **2** die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat und *para*-Nitrophenyl(methyl)carbonat. Diese



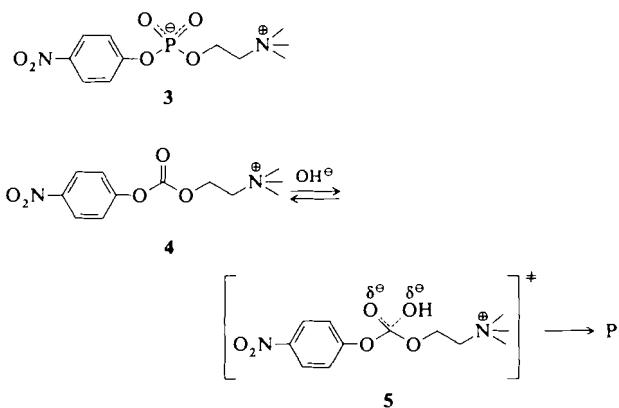
Untersuchung erweitert die Strategie der Stabilisierung von Übergangszuständen zur Erzeugung von katalytischen Antikörpern um eine neue Klasse von Peptidase-Inhibitoren. Die kinetischen Eigenschaften von Antikörpern gegen den Statin-ähnlichen Inhibitor **2** werden mit denen der zahlreichen Phosphonat-spezifischen Antikörper verglichen.

2. Phosphat- und Phosphonat-spezifische Antikörper

Eine große Zahl von Antikörpern gegen Analoga der Übergangszustände von hydrolytischen Reaktionen – ionische Verbindungen mit tetraedrisch konfiguriertem Phosphoratom – wurde charakterisiert; mehrere Beispiele davon werden besprochen.

2.1. Phosphocholin-bindende Antikörper MOPC 167 und T15

Zwei der zuerst charakterisierten katalytischen Antikörper, MOPC 167 und T15, waren nicht gegen ein synthetisches Immunogen gerichtet, sondern gehören zu einer gut untersuchten Klasse von Phosphocholin(PC)-bindenden Antikörpern. Diese Antikörper wurden bereits früher im Hinblick auf Spezifität der Ligandenbindung^[14, 15], Kinetik und biochemische Struktur^[16] charakterisiert. Beide sind spezifisch für *para*-Nitrophenylphosphocholin **3**, ein Analogon des Übergangszustands **5** der Hydrolyse des Carbonats **4** (P steht in diesem Beitrag auch für Produkt). Tatsächlich katalysieren MOPC 167 und T15 die Hydrolyse von **4** mit einer Michaelis-Menten-Kinetik^[17, 18].



Die Michaelis-Konstante K_M ist gleich der Substratkonzentration $[S]$, die zu halbmaximalen (k_{cat} $[E_T]$) Geschwindigkeiten führt; $[E_T]$ entspricht der gesamten Enzymkonzentration und k_{cat} ist die Geschwindigkeitskonstante des unimolekularen katalytischen Schritts. Die k_{cat} - und K_M -Werte von MOPC 167 und T15 sind $k_{cat} = 0.4 \text{ min}^{-1}$ und $K_M = 208 \mu\text{M}$ bzw. $k_{cat} = 0.32 \text{ min}^{-1}$ und $K_M = 708 \mu\text{M}$. Die hohe Spezifität der Antigen-Antikörper-Erkennung führt zu hochspezifischen Katalysatoren. Zum Beispiel wird *para*-Nitrophenyl(ethyl)carbonat nicht durch MOPC 167 umgesetzt. Die für MOPC 167 und T15 gemessenen Inhibitionskonstanten betragen $5 \mu\text{M}$ bzw. $55 \mu\text{M}$. Zwischen pH 6.25 und pH 8.0 sind beide Antikörper-katalysierten Reaktionen in bezug auf

das Hydroxid-Ion Reaktionen erster Ordnung. Der Vergleich der Geschwindigkeiten von OH^\ominus -katalysierter Reaktion, $k_{\text{OH}}[\text{OH}^\ominus]$ (korrigiert für die intramolekulare Unterstützung durch das Tetraalkylammonium-Ion), und Antikörper-katalysierter Reaktion, k_{kat} , erbrachte eine 11 500-fache Geschwindigkeitserhöhung mit MOPC 167 und eine 9 200fache Erhöhung mit T15. Die unterschiedliche Bindungsenergie von Übergangszustands-Analogon und Substrat (K_M/K_i) ist jedoch nicht für die gesamte Geschwindigkeitserhöhung verantwortlich. Es müssen also noch andere Faktoren zu der beobachteten Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit beitragen.

2.2. Röntgenstrukturanalyse des Phosphocholin-spezifischen Antikörpers McPC603

McPC603, ein Antikörper mit hoher Homologie zu T15, wurde röntgenstrukturanalytisch charakterisiert^[16]. Dies ermöglichte die direkte Identifizierung von Aminosäureresten der Bindungsstelle, die für die Katalyse verantwortlich sind (Abb. 2)^[19]. Phosphocholin wird in einer Vertiefung

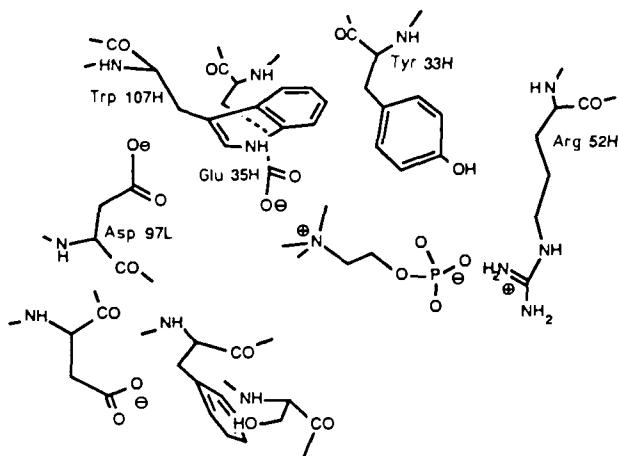


Abb. 2. Modell der Wechselwirkungen zwischen Phosphocholin und Aminosäureseitenketten in der Bindungsstelle von McPC603.

von McPC603 gebunden. Die Cholingeruppe liegt tief im Innern, während das Phosphat nach außen gerichtet ist und Kontakt zum umgebenden Wasser hat. Die Aminosäurereste Tyr 33H und Arg 52H der schweren Kette, die in allen bisher sequenzierten Phosphocholin-bindenden Antikörpern vorhanden sind, binden das Phosphat über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphat-Sauerstoffatomen. Die Röntgenstrukturanalyse ergab, daß die Bindungsstelle von McPC603 sterisch und elektronisch komplementär zum tetraedrischen, negativ geladenen Phosphatrest von Phosphocholin ist. In gleichem Maße wie dieses tetraedrische Phosphat den Übergangszustand der OH^\ominus -katalysierten Hydrolyse von **4** imitiert, sollten Phosphocholin-Antikörper in der Lage sein, das gebundene Carbonat für den Angriff des Hydroxid-Ions im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt auszurichten. Weil die Struktur des Grundzustands von **4** sich grundlegend von der des Übergangszustands der Hydrolyse, **5**, unterscheidet, resultieren unterschiedliche Bindungsaffinitäten des Antikörpers zu diesen

beiden Zuständen und daraus eine niedrigere Aktivierungsenergie der Reaktion.

2.3. Ortsspezifische Mutagenese des Phosphocholin-spezifischen Antikörpers S107

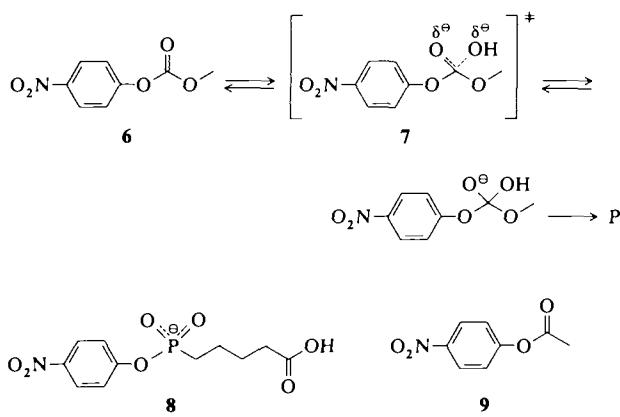
Mit Hilfe der ortsspezifischen Mutagenese des PC-spezifischen Antikörpers S107, der die gleiche variable Sequenz der schweren Kette wie T15 hat, ließ sich die katalytische Rolle der Aminosäurereste Arg 52H und Tyr 33H weiter aufklären^[20]. Beide Reste wurden ersetzt durch ungeladene oder entgegengesetzt geladene Aminosäuren oder solche mit Seitenketten, die spezielle katalytische Funktionen wie allgemeine Säure- oder Basen-Katalyse ermöglichen. Eine Mutante (Tyr → His 33H) zeigte erhöhte katalytische Aktivität gegenüber dem Wildtyp. Der Aktivitätsanstieg wurde der Funktion von His 33H als Base zugeschrieben. Die mutierten S107-Antikörper wurden in Myelomzellen exprimiert, die von sich aus keine Antikörper bilden. Die mutierte DNA wurde durch Elektroporation in die Myelomzellen eingeführt, wobei eine Azaserin/Hypoxanthin-Selektion angewendet wurde. Große Mengen der Mutanten (1–50 mg) wurden aus Ascites von immunsupprimierten Mäusen isoliert, denen transzidierte Zellen injiziert worden waren.

Ferner wurde Tyrosin 33H zu Phe, Glu, Asp und His mutiert. Alle Mutanten zeigten nur einen leichten Anstieg des K_M -Werts von **4** im Vergleich zum Wildtyp S107. Mit Ausnahme der His-Mutante war der Einfluß der Tyr-Mutationen auf die katalytische Aktivität gering. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Tyr 33H nicht an der Bindung oder Katalyse der untersuchten Reaktionen beteiligt ist. Durch den Austausch von Tyr zu His an Position 33H wird eine Base in unmittelbare Nachbarschaft zum gebundenen Carbonyl-Kohlenstoffatom von **4** gebracht, wie durch Molecular Modelling auf der Basis der Kristallstruktur von McPC 603 gezeigt wurde. Die His-33H-Mutante beschleunigt die Hydrolyse von **4** um den Faktor 6700 im Vergleich zur Umsetzung mit Methylimidazol in Lösung. Auch der Einbau einer Säurefunktion wie der β - oder γ -Carboxygruppe von Asp oder Glu in die Bindungsstelle sollte zu einer erhöhten Katalyse im Vergleich zum Wildtyp führen. Die Tatsache, daß diese Substitutionen den Umsatz nicht erhöhen, legt den Schluß nahe, daß die Bildung des negativ geladenen Übergangszustands bei der Hydrolyse von **4** bei neutralem pH in Gegenwart des negativ geladenen Carboxylats erschwert ist.

Arginin 52 wurde zu Lys, Gln und Cys mutiert. Die Lys-52H-Mutante zeigte eine nur wenig abgeschwächte katalytische Aktivität im Vergleich zum Wildtyp S107. Im Gegensatz dazu hatten die Gln-52H- und Cys-52H-Mutanten deutlich geringere Katalysewirkung. Dies ist vermutlich auf den Verlust der positiven Ladung zurückzuführen, die für die Stabilisierung des negativ geladenen Sauerstoffatoms des Übergangszustands der Reaktion nötig ist. Die Cys-Mutation wurde eingeführt, um die Derivatisierung mit Cofaktoren oder Signalmolekülen zu ermöglichen und semisynthetische katalytische Antikörper zu erzeugen^[21, 22]. Die Ergebnisse der Mutagenese von S107 unterstreichen die Bedeutung von elektrostatischen Wechselwirkungen für die Stabilisierung von Übergangszuständen und zeigen, daß die katalytische Aktivität eines Antikörpers durch gezielte Veränderungen erhöht werden kann.

2.4. Antikörper gegen Phosphonat- und Phosphoamidat-Übergangszustands-Analoga

Nachdem Antikörper, die mehr zufällig Übergangszustands-Analoga der Carbonat-Hydrolyse binden, studiert worden waren, wurde versucht, Antikörper gezielt zu entwickeln, die Übergangszustände von spezifischen Reaktionen binden. Die Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl(methyl)carbonat **6** verläuft über den tetraedrischen, negativ geladenen Übergangszustand **7**. Das entsprechende Phosphonat-Übergangszustands-Analogon **8** wurde synthetisiert und an Napfschnecken-Hämocyanin (keyhole limpet hemocyanin, KLH) gekuppelt [23]. Da kleine Moleküle nicht immunogen sind, müssen sie kovalent an ein Protein gebunden werden, um eine Immunantwort hervorzurufen. Auf diese Weise wurden 14 monoklonale Antikörper gegen **8** gewonnen. Es wurde dann geprüft, ob sie die Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl(methyl)carbonat **6** und *para*-Nitrophenylacetat **9** beschleunigen. Von den 14 Antikörpern katalysierten zwei die gewünschte Reaktion und wurden durch das freie Hapten **8** inhibiert. Die Hemmung durch das freie Hapten ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß die Hydrolyse direkt durch die Bindungsstelle des Antikörpers katalysiert wird. Der Antikörper 48G7-4A1 katalysierte die Hydrolyse des Esters **9** mit $k_{\text{kat}} = 7.4 \text{ min}^{-1}$ und $K_M = 430 \mu\text{M}$. Die für die Hydrolyse des verwandten Carbonats **6** ermittelten Werte waren $k_{\text{kat}} = 26.2 \text{ min}^{-1}$ und $K_M = 360 \mu\text{M}$. Der Umsatz wurde um den Faktor 1600 für **9** und 7300 für **6** gegenüber dem unkatalysierten Umsatz gesteigert. Mit dem freien Hapten **8** wurde Inhibition mit einem K_I -Wert von 330 nm gefunden.



Die Katalyse könnte auf mehreren Mechanismen beruhen: Direkter OH^\ominus -Angriff, allgemeine Basenkatalyse oder Acylierung des Antikörpers mit anschließender Hydrolyse (Abb. 3). Durch die pH-Abhängigkeit der Antikörperkatalyse zwischen pH 7.5 und 9.4 konnte gezeigt werden, daß die Reaktion erster Ordnung in Bezug auf Hydroxid-Ionen ist, was für einen direkten Angriff des Hydroxid-Ions innerhalb dieses pH-Bereichs spricht. Wenn allgemeine Basenkatalyse vorläge, würde die pH-Abhängigkeit von k_{kat} die Abhängigkeit vom $\text{p}K_A$ eines spezifischen Aminosäurerests der Bindungsstelle widerspiegeln. Wäre die Reaktion tatsächlich basenkatalysiert, könnte ihr $\text{p}K_A$ nicht im Bereich von 7.5–9.4 liegen. Kinetische Untersuchungen mit hohen Antikörperkonzentrationen zeigten keinen starken Anstieg der *para*-Nitrophenolat-Konzentration zu Beginn der Reaktion, so daß der dritte Mechanismus, der eine Enzymacylierung beinhaltet, ausgeschlossen werden kann. Durch chemische Modifikation konnte gezeigt werden, daß sich Tyrosin-, Arginin- und Histidinreste in der Bindungsstelle dieses Antikörpers befinden [24]. Interessanterweise wurden bei dem Antikörper S107, der die Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl(cholin)carbonat **4** katalysiert, ebenfalls ein Arginin und ein Tyrosin gefunden. Vielleicht wird wie bei S107 das Sauerstoff-Anion, das im Übergangszustand der Ester- oder Carbonat-Hydrolyse gebildet wird, durch den Argininrest stabilisiert.

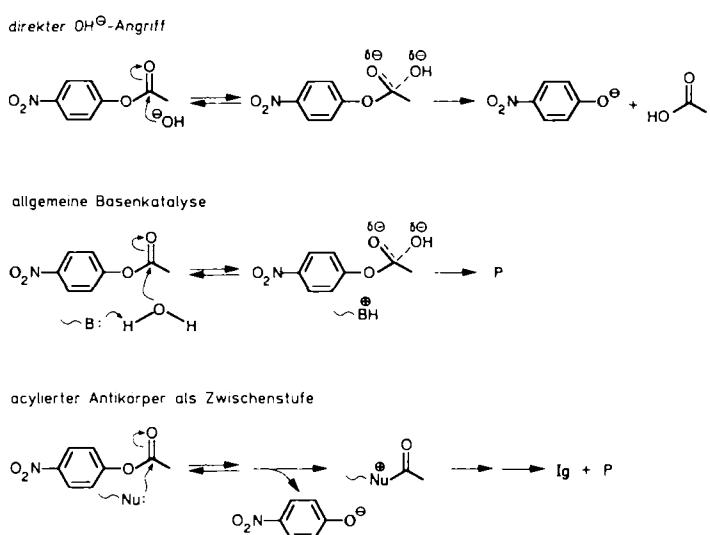
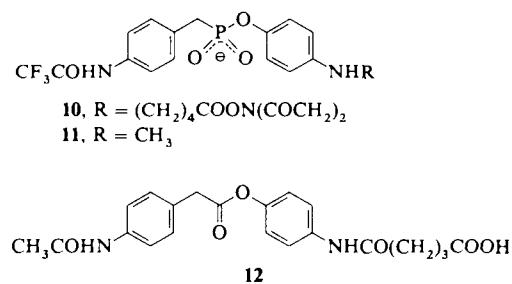


Abb. 3. Mögliche Reaktionsmechanismen für die Hydrolyse von **9** durch den Antikörper 48G7-4A1. Ig = Immunglobulin, P = Produkt.

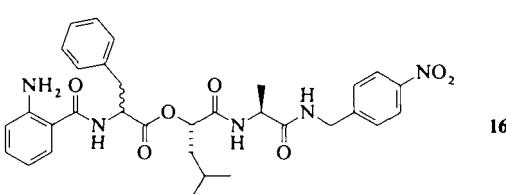
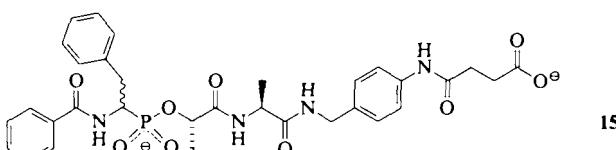
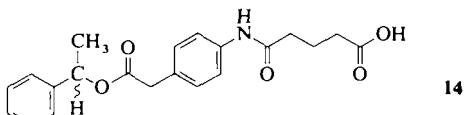
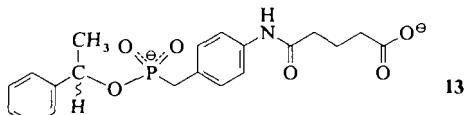
tet, ausgeschlossen werden kann. Durch chemische Modifikation konnte gezeigt werden, daß sich Tyrosin-, Arginin- und Histidinreste in der Bindungsstelle dieses Antikörpers befinden [24]. Interessanterweise wurden bei dem Antikörper S107, der die Hydrolyse von *para*-Nitrophenyl(cholin)carbonat **4** katalysiert, ebenfalls ein Arginin und ein Tyrosin gefunden. Vielleicht wird wie bei S107 das Sauerstoff-Anion, das im Übergangszustand der Ester- oder Carbonat-Hydrolyse gebildet wird, durch den Argininrest stabilisiert.

Der Antikörper, der die größte Umsatzsteigerung bei einer Ester-Hydrolyse bewirkt, wurde mit Hilfe eines Phosphonat-Übergangszustands-Analogons erzeugt. Lerner, Tramontano et al. isolierten 20 für Phosphonat **10** spezifische Antikörper. Davon katalysierten fünf die Hydrolyse des Esters **12** [25]. Die Geschwindigkeitskonstanten für den aktivsten Antikörper waren $k_{\text{kat}} = 20 \text{ s}^{-1}$ und $K_M = 1.5 \text{ mM}$. Das freie Hapten **11** bindet extrem fest mit einem $K_I = 50 \text{ nM}$. Der große Affinitätsunterschied dieses Antikörpers zu Substrat und Inhibitor ist der wichtigste Grund für die große Umsatzsteigerung von $k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}} = 6.25 \times 10^5$.



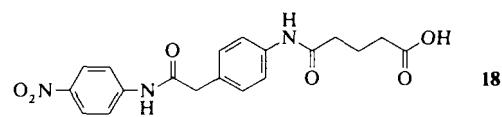
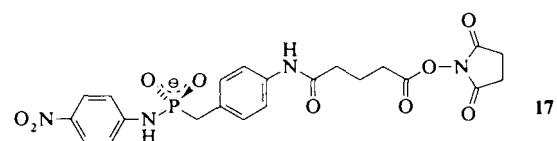
Es wurde gezeigt, daß Antikörper die stereospezifische Hydrolyse von nicht aktivierten Estern katalysieren können. Antikörper gegen die Phosphonate **13** und **15** katalysierten die stereospezifische Hydrolyse von **14** bzw. **16**. In beiden Fällen wurde mit dem Racemat des Haptens immunisiert. Von 18 Antikörpern, die spezifisch für **13** waren, katalysierten neun die Hydrolyse von *(R)*-**14** und zwei die Hydrolyse von *(S)*-**14** [26]. Zwei Antikörper, je einer der beiden Spezifitäten, wurde weiter charakterisiert. Die Hydrolyse von *(R)*-

14 wurde durch den Antikörper 2H6 um den Faktor 80 000 beschleunigt, wogegen der (S)-14-spezifische Antikörper 21H3 nur eine moderate 1600fache Umsatzsteigerung gegenüber der unkatalysierten Reaktion bewirkte. Die R/S-Selektivität der Antikörper war größer als 98 %.



Von 25 Antikörpern, die spezifisch für das Tripeptid-Phosphonat 15 waren, beschleunigten 18 die Hydrolyse der entsprechenden Ester^[27]. Interessanterweise wurden ausschließlich Antikörper gegen ein Enantiomer gefunden. Alle 18 Antikörper reagierten selektiv mit dem D-Phenylalanyl-Isomer von 16. Die Selektivität für D- gegenüber L-Phenylalanin war bei drei der fünf charakterisierten Antikörper größer als 99.5 %. Die mäßige Umsatzsteigerung um den Faktor 50–300 könnte eine Folge der Größe des Immunoogens sein. Das tetraedrische Phosphonat trägt im Vergleich weniger zur gesamten Bindungsenergie der Bindung des Haptens an den Antikörper bei als bei kleineren Haptens. Das Substrat 16 enthält eine fluorogene und eine quenchende Gruppe am Amino- bzw. am Carboxy-Terminus. Diese Gruppen ermöglichen es, die Hydrolyse des Substrats durch Messung des Fluoreszenzanstiegs zu verfolgen, der durch die Abspaltung der fluoreszierenden 2-Aminobenzoyl- von der quenchenden 4-Nitrobenzylamidgruppe zustande kommt. Dieser empfindliche Nachweis könnte ein direktes Screening von ELISA-Platten^[28] oder λ-Genbanken, die bis zu 10⁶ verschiedene F_{AB}-Fragmente exprimieren^[29], ermöglichen. Dadurch würde die Identifizierung von katalytischen Antikörpern sehr vereinfacht. Diese beiden Beispiele zeigen, daß sehr gute Stereoselektivität mit Antikörpern bei großen und kleinen Substraten mit dem Asymmetriezentrum im Alkohol oder der Acylgruppe des Substrats erreicht werden kann.

Der Antikörper NPN43C9 gegen das Phosphoamidat 17 katalysiert die Hydrolyse der aktivierten Amidbindung von 18^[30]. Es wurde eine Umsatzsteigerung um den Faktor



2.5×10^5 gegenüber der unkatalysierten Reaktion gefunden. Diese Steigerung ist viel größer als der Affinitätsunterschied zwischen Übergangszustand und Substrat ($\Delta\Delta G = -2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$). Diese Differenz in den Bindungsenergien wäre nur für eine 100fache Umsatzerhöhung ausreichend. Es müssen auch hier wieder andere Faktoren wie Säure/Base-Katalyse für die Steigerung verantwortlich sein. 150 mM NaCl hemmen die Katalyse vollständig. Eine Struktureigenschaft dieses Haptens, die die Induktion einer Säure/Base-Katalyse verursachen könnte, ist nicht erkennbar, weil die NH-Gruppe des Phosphoamidats nicht geladen ist.

3. Peptidase-Inhibitoren vom Statin-Typ

Zusätzlich zu den negativ geladenen Phosphonaten sind für hydrolytische Enzyme auch eine Reihe von ungeladenen Analoga von Übergangszuständen bekannt. Der bestcharakterisierte davon ist der potente Pepsin-Inhibitor Pepstatin, der das Aminosäure-Analogon Statin enthält (Abb. 4).

Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta

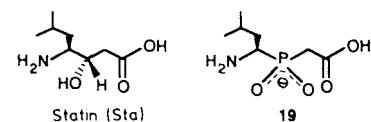
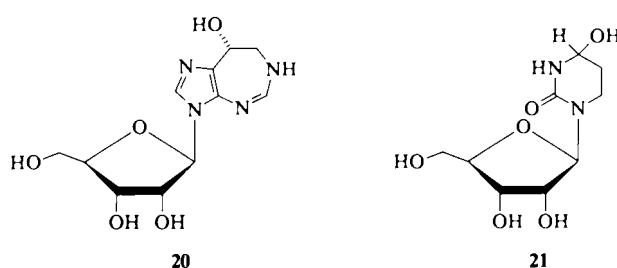


Abb. 4. Strukturen von Pepstatin und dem Phosphinat-Analogon 19 der ungewöhnlichen Aminosäure Statin.

Die Inhibitionskonstante K_i für Pepsin beträgt 46 pm; Pepstatin ist damit einer der stärksten bekannten Enzyminhibitoren. Statin muß als Dipeptid-Analogon angesehen werden, bei dem die Amidbindung der Pepsin-Substrate durch eine Hydroxygruppe ersetzt ist. Es wird angenommen, daß die Hydroxygruppe ein Wassermolekül verdrängt, das normalerweise Kontakt zu zwei Aspartatresten von Pepsin hat, die an der Katalyse beteiligt sind. Nach der Röntgenkristallstrukturanalyse des Pepstatinkomplexes der Aspartat-Protease von *Rhizopus chinensis* befindet sich die Hydroxygruppe in einem Abstand zu den beiden Aspartatresten, der innerhalb der Länge von Wasserstoffbrücken liegt^[30]. Deshalb muß Statin in doppelter Hinsicht als Substrat betrachtet werden; es enthält sowohl die Bindungsdeterminanten des Peptidsubstrats als auch des enzymgebundenen Wassers, das an die zu spaltende Amidbindung des Substrat addiert. Der sp^3 -hybridisierte, OH-tragende C-Atom imitiert dabei den tetraedrischen Übergangszustand der Amid-Hydrolyse.

Die beiden Klassen von Inhibitoren, der „Phosphor-Typ“ und der „Statin-Typ“, können direkt verglichen werden, da das Phosphinat-Analogon von Statin, **19**, synthetisiert werden konnte^[31]. Der K_i -Wert des Pepstatin entsprechenden Peptids, in dem Statin durch das Phosphinat-Analogon **19** ersetzt ist, beträgt $< 70 \text{ pm}$. Dies bedeutet, daß die beiden Inhibitorklassen ungefähr das gleiche inhibitorische Potential haben.

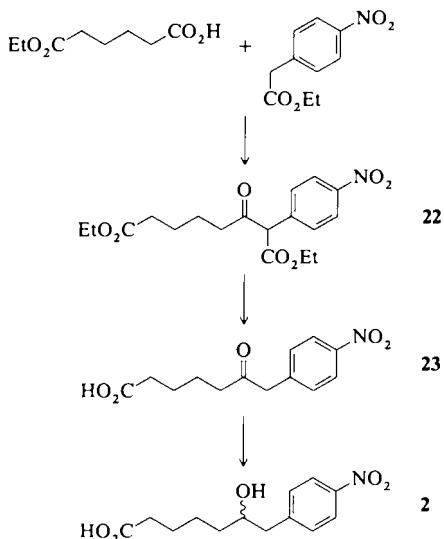


Außer den Peptidase-Inhibitoren konnten auch Inhibitoren von Nucleotid-Biosynthesen isoliert werden, die der Klasse der ungeladenen Analoga von Übergangszuständen angehören. Coformycin **20** inhibiert das Enzym Adenosin-Desaminase und ist einer der stärksten Enzyminhibitoren mit einem $K_i = 2.5 \text{ pm}^{[32]}$. Diese Enzym hydrolysiert die Amidingruppe von Adenin, wodurch Inosin entsteht. Tetrahydrouridin **21** ist eine weitere Verbindung dieser Klasse von Inhibitoren^[13]. Eine interessante, noch unverstandene Gemeinsamkeit der Inhibitoren dieser Klasse ist ihre langsame Bindung an das Enzym. Die Bildungskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes ist äußerst niedrig; die Halbwertzeit der Dissoziation von Coformycin und Adenosin-Desaminase beträgt 24 Stunden. Aufgrund der hohen Bindungskonstanten dieser Übergangszustands-Analoga könnte man erwarten, daß mit Haptenen mit ähnlichen Strukturmerkmalen katalytische Antikörper induziert werden können.

4. Hydrolytische Antikörper gegen ungeladene Haptene

Wir haben fünf Antikörper gegen racemische 6-Hydroxy-7-(4-nitrophenyl)heptansäure **2** erzeugt, einem Statin-ähnlichen Übergangszustands-Analogon, das die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat **9** und *para*-Nitrophenyl(methyl)carbonat **6** inhibiert. Dieses Hapten wurde ausgewählt, da es ein ungeladenes Analogon von Haptene **8**^[23] mit einer Hydroxygruppe ist. Ein direkter Vergleich der katalytischen Eigenschaften von Antikörpern gegen diese beiden Haptene ist sehr einfach, da sie für die Katalyse der gleichen Reaktionen gewonnen wurden. Tatsächlich wurde ein Antikörper (7K16.2) gefunden, der die Hydrolyse von **6** und **9** katalysiert. Dies ist das erste Beispiel dafür, daß mit einem ungeladenen Hapten ein als Esterase wirkender Antikörper erzeugt werden kann. Vor dem Hintergrund der Mutagenesestudie mit Phosphocholin-bindenden Antikörper S107^[20], die die Bedeutung der Komplementarität der Ladungen von Antikörperbindungsstelle und Übergangszustand des Substrats vor Augen führte, ist dies ein sehr überraschendes Ergebnis. Die Hydroxycarbonsäure **2** wurde aus Adipinsäuremono-

ethylester und *para*-Nitrophenylacetat über **22** und **23** hergestellt (Schema 1).



Schema 1.

Experimentelles

22: Zu einer Lösung von 102.3 mg (0.59 mmol) Adipinsäuremonoethylester in 0.6 mL Tetrahydrofuran wurden unter Rühren 100 mg (0.62 mmol) Carbonyldiimidazol zugegeben und dann noch 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu einer Lösung von 0.62 mL (0.62 mmol) von 1m Natriumhexamethyldisilazid in Tetrahydrofuran wurde dann unter Rühren bei -78°C unter Argon langsam eine Lösung von 123.3 mg (0.59 mmol) Ethyl-4-Nitrophenylacetat in 0.5 mL Tetrahydrofuran gegeben, wobei sich eine purpurrote Reaktionsmischung bildete. Nach 5 min wurde die Lösung des Imidazolids langsam zugegeben. Die Mischung wurde zuerst auf 0°C und nach 30 min auf Raumtemperatur erwärmt. Nach weiteren 30 min wurde der Reaktionsansatz zwischen Dichlormethan und wässriger NH_4Cl -Lösung verteilt. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Aus dem Rückstand wurden nach Chromatographie an Kieselgel mit 20 % Ethylacetat in Hexan als Laufmittel 182 mg (0.5 mmol, 85%) 22 isoliert. IR (Film) $\tilde{\nu}$ = 3000, 1730, 1650, 1600, 1520, 1350 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): (Keto- und Enolautomere im Gleichgewicht) δ = 1.20 (m, 6H), 4.15 (m, 4H), 7.33, 7.55 (d, 2H, J = 9 Hz), 8.21, 8.24 (d, 2H, J = 9 Hz); Hochauflösungs-FAB-MS: m/z 366.1546 ($M + \text{H}^{\oplus}$).

23: Eine Lösung von 145 mg (0.4 mmol) **22** in 2 mL 40% wässriger H_2SO_4 wurde im Ölbad 15 min auf 100 °C erwärmt. Die erkaltete Reaktionsmischung wurde mit Wasser verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen, mit MgSO_4 getrocknet und eingeeignet. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit 5% Methanol in Ethylacetat als Laufmittel gereinigt und ergab 44 mg (0.16 mmol, 42%).
23. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 2950, 1710, 1605, 1520, 1340 cm^{-1} ; Fp = 103–105 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.63 (m, 4H), 2.36 (t, 2H, J = 7 Hz), 2.55 (t, 2H, J = 7 Hz), 3.83 (s, 2H), 7.36 (d, 2H, J = 9 Hz), 8.19 (d, 2H, J = 9 Hz); Hochauflösungs-FAB-MS: m/z 266 1021 ($M + \text{H}^+$).

2: Zu einer Lösung von 44 mg (0.16 mmol) 23 in 1 mL Methanol wurden bei 0 °C unter Rühren 13 mg (0.34 mmol) Natriumborhydrid gegeben. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und zwischen Dichlormethan und wäbrigem KHSO_4 verteilt. Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und eingekocht: 44 mg (0.16 mmol, 100 %). 2, IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3000, 1710, 1700, 1600, 1510, 1320 \text{ cm}^{-1}$; $\text{Fp} = 81-84^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.6$ (m, 6H), 2.37 (t, 2H, $J = 7 \text{ Hz}$), 2.79 (dd, 1H, $J = 8.14 \text{ Hz}$), 2.91 (dd, 1H, $J = 4.14 \text{ Hz}$), 3.90 (m, 1H), 7.38 (d, 2H, $J = 9 \text{ Hz}$), 8.16 (d, 2H, $J = 9 \text{ Hz}$); Hochauflösendes ESR-MS: m/z 268 1195 ($M + \text{H}^+$).

4.1. Isolierung und Charakterisierung des Antikörpers 7K16.2

Das racemische Hapten 2 wurde an die Carrierproteine KLH und Rinderserumalbumin (BSA) über den *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierten Ester, der bei pH 9.0 mit oberflächenexponierten ϵ -Aminogruppen von Lysinresten reagiert^[33], gekuppelt. Durch UV-Differenzspektroskopie

($\varepsilon_{400,2} = 9100$) wurde ein Verhältnis von Hapten zu Protein von 7 pro KLH-Monomer und 3 pro BSA-Monomer ermittelt.

Durch Fusion von P3X63-Myelomzellen mit Milzzellen von Swiss-Webster-Mäusen^[34], die mit KLH-2-Konjugaten immunisiert waren, wurden fünf monoklonale Antikörper isoliert. Die monoklonalen Antikörper wurden *in vivo* vermehrt und mit Hilfe von Affinitätschromatographie an Protein-A-gebundener Sepharose 4B isoliert^[35]. Die weitere Reinigung erfolgte mit Hilfe einer Pharmacia-FPLC-Mono-S 10/10-Kationenaustauschersäule. Die Reinheit des Antikörpers wurde mit einer 12.5%-SDS-Polyacrylamidelektrophorese mit Coomassie-Blue-Färbung bestimmt^[36]; sie betrug > 95 %. Einer dieser fünf Antikörper (7K16.2) beschleunigte die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat **9** und *para*-Nitrophenyl(methyl)carbonat **6** und wurde durch das freie Hapten gehemmt.

Die durch den Antikörper 7K16.2 katalysierten Reaktionen folgten der klassischen Michaelis-Menten Kinetik. Bei pH 7.5 aufgenommene Lineweaver-Burke-Diagramme waren linear (Abb. 5), und es ergaben sich: $k_{\text{kat}}(9) = 0.72 \text{ min}^{-1}$,

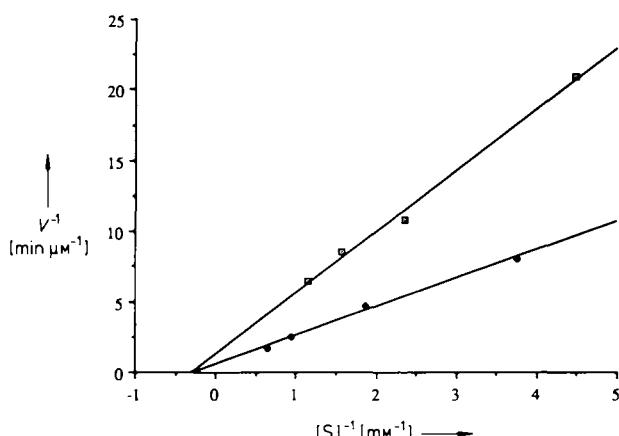


Abb. 5. Lineweaver-Burke-Diagramm der vom Antikörper 7K16.2 katalysierten Hydrolyse von **6** (□) und **9** (●). Die Geschwindigkeiten wurden spektrophotometrisch durch Messung des anfänglichen Absorptionsanstiegs bei 400 nm bestimmt (*para*-Nitrophenol $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$, $\varepsilon = 4.05$). Die Konzentration von 7K16.2 (2.5 μM) wurde durch die Absorption bei 280 nm bestimmt; dabei wurde E (1 cm, 0.1%) = 1.37 und $M_1 = 150\,000$ für IgG zugrunde gelegt. 7K16.2 wurde bei 30 °C in 10 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, pH 7.5 vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL einer Stammlösung von **6** oder **9** in Tetrahydrofuran (THF) gestartet; es wurde dadurch eine Endkonzentration von 2 % THF erreicht. Der unkatalysierte Umsatz wurde unter den gleichen Bedingungen gemessen und ergab $k_{\text{unkat}}(6) = 3.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{unkat}}(9) = 3.3 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$.

$K_M(9) = 3.65 \text{ mM}$; $k_{\text{kat}}(6) = 0.31 \text{ min}^{-1}$, $K_M(6) = 3.33 \text{ mM}$. Die Konstanten für die unkatalysierte Reaktion unter gleichen Bedingungen waren $k_{\text{unkat}}(9) = 3.33 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ und $k_{\text{unkat}}(6) = 3.2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Der Antikörper wurde durch das freie Hapten **2** mit einem K_i -Wert von 140 μM kompetitiv gehemmt (Abb. 6)^[37]. Wie auch schon bei anderen hydrolysierenden katalytischen Antikörpern ist die unterschiedliche Bindungsenergie von Substrat und Inhibitor $K_M(6)/K_i = 24$, $K_M(9)/K_i = 26$ bei 7K16.2 nicht allein für die Umsatzsteigerung $k_{\text{kat}}(6)/k_{\text{unkat}}(6) = 930$ und $k_{\text{kat}}(9)/k_{\text{unkat}}(9) = 2250$ verantwortlich. Bei der gleichen Reaktion, jedoch durch den Antikörper 48G7-4A1 gegen das Phosphonat **8** katalysiert, betrug das Verhältnis der Bindungsenergien $K_M(6)/K_i(8) = 1300$. Demgegenüber wurde eine Steigerung des

Umsatzes um den Faktor $k_{\text{kat}}(6)/k_{\text{unkat}}(6) = 7300$ gefunden. Da die Diskrepanz zwischen den beiden Werten für den Antikörper 7K16.2 sehr viel ausgeprägter ist, muß angenommen werden, daß andere Faktoren, die neben der Stabilisierung von Übergangszuständen ebenfalls die Katalyse beeinflussen, größere Bedeutung haben als bei dem Antikörper 48G7-4A1. Um die Unterschiede von katalytischen Antikörpern, die mit verschiedenen Inhibitor-Klassen erzeugt wurden, genauer zu verstehen, muß eine große Zahl von Antikörpern analysiert werden. Mit Hilfe der neuen Technik der λ -Genbanken müßten statistisch signifikante Zahlen verschiedener Antikörper zugänglich sein^[29].

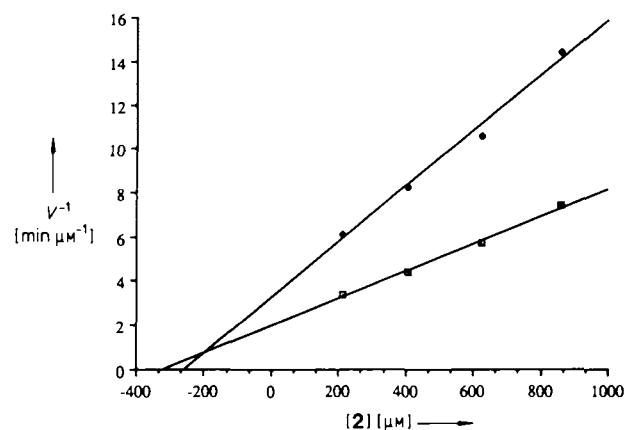


Abb. 6. Dixon-Diagramm der Inhibition des Antikörpers 7K16.2 durch **2** bei einer Antikörperkonzentration von 2.5 μM . Die Werte wurden für zwei Konzentrationen des Substrats **9** ermittelt: 500 μM (●) und 1 mM (□). Die Pufferbedingungen waren die gleichen wie in Abbildung 5 angegeben.

Die Katalyse einer energetisch schwierigeren Hydrolyse durch den Antikörper 7K16.2 wurde ebenfalls untersucht. Die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetanilid wurde bei pH 9.0 nicht beschleunigt, wie durch HPLC mit *para*-Nitrobenzamid als internem Standard ermittelt wurde. In einer weiteren Untersuchung wurden Antikörper gegen ein KLH-Coformycin-Konjugat erzeugt. Keiner der acht Coformycin-spezifischen Antikörper beschleunigte die Umsetzung von Adenosin zu Inosin ($k_{\text{unkat}} = 1.8 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$). Bei diesem Experiment wurde der Umsatz anhand der Freisetzung von Ammoniak^[38] gemessen. Möglicherweise können durch weiteres Screening von Antikörpern gegen diese Haptene in Zukunft katalytische Antikörper gefunden werden.

5. Ausblick

In den letzten fünf Jahren wurde die Vielfalt des Immunsystems dazu genutzt, Antikörper-Katalysatoren für viele Reaktionen herzustellen. Es wurden mehrere Strategien zur Erzeugung von katalytischen Antikörpern entwickelt. Einige Konzepte müssen noch auf ihre Tauglichkeit geprüft werden, z. B. das der Substratdestabilisierung durch molekulare Deformation und das der genetischen Selektion zur Identifizierung von zufällig oder durch gezielte Mutagenese erzeugten aktiveren Katalysatoren. Die effiziente und selektive Hydrolyse von Peptiden, Nucleinsäuren und Kohlenhydraten wird auch in Zukunft ein Hauptziel der Erforschung katalytischer

Antikörper sein. Antikörper werden eine immer wichtigere Rolle in der Chemie übernehmen. Derzeit werden neue aufregende Ansätze entwickelt, um die Diversität biologischer Systeme zu erschließen^[39–41]. Diese Fortschritte werden zweifellos zu neuen Molekülen mit neuen biologischen Eigenschaften führen, wie das in ganz ähnlicher Weise auch bei der Entwicklung der katalytischen Antikörper der Fall war.

Eingegangen am 24. Juli 1990 [A 793]

- [1] M. M. Davis, P. J. Bjorkmann, *Nature (London)* **334** (1988) 395.
 [2] P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **101** (1989) 1336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **28** (1989) 1283.
 [3] P. G. Schultz, *Acc. Chem. Res.* **22** (1989) 287.
 [4] K. M. Shokat, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Immunol.* **8** (1990) 335.
 [5] P. G. Schultz, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *Chem. Eng. News* **68** (1990) Nr. 22, S. 26.
 [6] W. P. Jencks: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York 1969.
 [7] L. Pauling, *Am. Sci.* **36** (1948) 51.
 [8] R. Wolfenden, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **5** (1976) 271.
 [9] P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Biochemistry* **22** (1983) 4618.
 [10] M. W. Holladay, F. G. Salituro, D. H. Rich, *J. Med. Chem.* **30** (1987) 374.
 [11] K. N. Allen, R. H. Abeles, *Biochemistry* **28** (1989) 135.
 [12] W. M. Kati, D. T. Pals, S. Thaisrivongs, *Biochemistry* **26** (1987) 7621.
 [13] D. R. Rich, *J. Med. Chem.* **28** (1985) 263.
 [14] A. M. Goetze, J. H. Richards, *Biochemistry* **16** (1977) 228.
 [15] L. G. Bennett, C. P. Glaudemans, *Biochemistry* **18** (1979) 3337.
 [16] D. M. Segal, E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. Rudikoff, D. Potter, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 4298.
 [17] S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science (Washington D.C.)* **234** (1986) 1570.
 [18] S. J. Pollack, P. G. Schultz, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52** (1987) 97.
 [19] Y. Satow, G. H. Cohen, E. A. Padlan, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* **190** (1986) 593.
 [20] D. Y. Jackson, J. R. Prudent, E. P. Baldwin, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990), im Druck.
 [21] S. J. Pollack, G. R. Nakayama, P. G. Schultz, *Science (Washington D.C.)* **242** (1988) 1038.
 [22] S. J. Pollack, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 1929.
 [23] J. W. Jacobs, P. G. Schultz, R. Sugasawara, M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1988) 2174.
 [24] J. W. Jacobs, *Dissertation*, University of California, Berkeley 1989.
 [25] A. Tramontano, A. A. Ammann, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 2282.
 [26] K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington D.C.)* **224** (1989) 437.
 [27] S. J. Pollack, P. Hsuan, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 5961.
 [28] E. Engvall, P. Perlmann, *J. Immunol.* **109** (1972) 129.
 [29] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington D.C.)* **246** (1989) 1275.
 [30] K. D. Janda, D. Schloeder, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science (Washington D.C.)* **241** (1988) 1188.
 [31] P. A. Bartlett, W. B. Kezer, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 4282.
 [32] L. Frick, J. P. Mac Neela, R. Wolfenden, *Bioorg. Chem.* **15** (1987) 100.
 [33] B. Erlanger, *Methods Enzymol.* **70** (1980) 85.
 [34] R. Sugasawara, C. Prato, J. Sippel, *Infect. Immun.* **42** (1983) 863.
 [35] G. Kronvall, H. Grey, R. Williams, *J. Immunol.* **105** (1972) 1116.
 [36] C. Tuerk, L. Gold, *Science (Washington D.C.)* **249** (1990) 505.
 [37] U. Laemmli, *Nature (London)* **227** (1970) 680.
 [38] G. Dixon, *Biochem. J.* **55** (1953) 170.
 [39] A. L. Chaney, E. P. Marbach, *Clin. Chem.* **8** (1962) 130.
 [40] J. J. Devlin, L. C. Panganiban, P. E. Devlin, *Science (Washington D.C.)* **249** (1990) 404.
 [41] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science (Washington D.C.)* **249** (1990) 386.