

Каталитические антитела: перспективы использования в органическом синтезе

Н.К.Кочетков

*Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук
117913 Москва, Ленинский просп., 47, факс (095) 135–5328*

Обобщены данные о каталитических антителах — биокатализаторах нового поколения. Рассмотрены принципы дизайна и техники получения каталитических антител всех известных классов, сгруппированных по типу катализируемых ими превращений органических соединений. Приведены данные об их эффективности, регио- и стереоспецифичности действия, высказаны соображения о механизме их каталитического действия, а также оценена возможность их использования в тонком органическом синтезе.

Библиография — 124 ссылки.

Оглавление

I. Введение	1099
II. Основные принципы и техника получения каталитических антител	1100
III. Гидролиз сложноэфирной связи и другие реакции трансацилирования	1102
IV. Гидролиз и образование амидной связи	1108
V. Гидролитический разрыв углерод-кислородной связи в эфирах енолов и ацеталей	1110
VI. Образование углерод-углеродных связей	1113
VII. Реакции 1,2-элиминирования (β -элиминирование)	1121
VIII. Образование и раскрытие оксиранового цикла	1124
IX. Реакции восстановления и окисления	1125
X. Другие реакции	1126
XI. Заключение	1129

I. Введение

Благодаря разработке огромного количества методов создания углеродного скелета и его направленной функционализации в настоящее время при необходимости можно получать органические соединения практически любой степени сложности. Обычно синтез соединений сложной структуры осуществляют в несколько стадий. При этом решающим фактором, определяющим успех, является эффективность и однозначность каждой стадии. Эффективность реакции определяется ее скоростью и выходом продукта, а однозначность — ее регио- и стереоспецифичностью. Это позволяет получить максимально чистое вещество и избежать сложной процедуры выделения и очистки. По мере развития тонкого органического синтеза и получения все более сложных структур требования к эффективности и специфичности реакции непрерывно возрастают. При этом использование в многостадийных синтезах чисто химических методов нередко оказывается недостаточным. В последнее время для создания углеродного скелета соединений и его функционализации

на отдельных стадиях синтеза все чаще стали применять ферментативные реакции.

Использование ферментов часто позволяет проводить реакцию быстрее и, благодаря их высокой регио- и, особенно, стереоселективности, чище. Поэтому методы ферментативного и химико-ферментативного синтеза быстро внедряются в практику тонкого органического синтеза. Препятствием для широкого использования биосинтетических методов часто является малая доступность природных ферментов нужной активности и специфичности. Это требует дополнительной трудоемкой работы по поиску подходящего и доступного источника фермента, разработке методов его выделения и очистки и детальному исследованию его специфичности. Поэтому в настоящее время в лабораторной и промышленной практике используется довольно ограниченный круг природных ферментов, катализирующих ограниченный круг химических превращений.

Давней мечтой химиков-органиков является получение искусственных ферментов с высокой эффективностью и, главное, с заданной избирательностью действия. Такие ферменты должны изготавливаться в лаборатории и направленно использоваться для осуществления нужной реакции. Подобные искусственные ферменты заданной специфичности («tailor-made enzymes») позволили бы сильно повысить эффективность органического синтеза и открыли бы пути к получению новых классов органических соединений.

Природные ферменты являются высокомолекулярными белками с однозначной структурой. Их каталитическая активность и избирательность действия заданы строго опре-

Н.К.Кочетков. Академик, профессор, почетный директор ИОХ РАН. Телефон: (095)137–6148.

Область научных интересов: химия углеводов, новые синтетические методы, выделение, синтез и химические свойства олиго- и полисахаридов, синтез биологически активных веществ и антибиотиков.

Дата поступления 3 февраля 1998 г.

деленной последовательностью аминокислот белковой цепи. Это, в свою очередь, предопределяет конформацию белковой молекулы и, в конечном счете, формирование пространственной структуры активного центра фермента.

Казалось бы, что наиболее простым путем получения искусственного фермента является его прямой синтез. Но несмотря на общеизвестные успехи в синтетической химии белков, этот путь представляется малоэффективным не только из-за своей трудоемкости, но и потому, что требует информации о первичной структуре целевого белка-фермента. Однако определение аминокислотной последовательности само по себе является сложным и трудоемким исследованием.

Решением проблемы явился иной подход к получению искусственных ферментов с заданной специфичностью. Он основан на биосинтезе с использованием мощного иммунологического аппарата клетки, который отличается способностью синтезировать огромное разнообразие белковых молекул.

Как известно, иммунная система животных служит для биосинтеза антител — защитных белков, предназначенных для «нейтрализации» попавших в организм чужеродных молекул и более сложных комплексов, так называемых антигенов. Иммунная система создает белковую молекулу антитела, структура которого соотносится со структурой антигена таким образом, что активный центр антитела оказывается комплементарным специфической части антигена, так называемого гаптена. Антитело образует с антигеном достаточно прочный комплекс и тем самым «нейтрализует» его действие. Иными словами, биосинтетический аппарат иммунной системы делает возможным получение белковой молекулы, в которой формируется активный центр, структура и пространственное строение которого задаются структурой вводимого в организм антигена. Этот принцип и был использован для получения искусственных ферментов.

Согласно современным представлениям, каталитическое действие природного фермента заключается, в первую очередь, в облегчении перехода субстрата реакции из основного состояния в возбужденное переходное состояние. Последнее, стабилизируясь в активном центре фермента, превращается далее в продукт или продукты реакции. Таким образом, для проявления каталитической активности в белковой молекуле должен прежде всего сформироваться активный центр, способный облегчить формирование и стабилизацию переходного состояния субстрата. Следовательно, при биосинтезе в иммунном аппарате антитела, обладающего каталитическими свойствами, нужно использовать антиген, строение которого моделирует переходное состояние, возникающее в каталитической реакции. Получить стабильную молекулу, соответствующую переходному состоянию, невозможно, так как оно представляет собой неустойчивый комплекс. Поэтому в качестве антигенов, генерирующих каталитически активные антитела, были использованы соединения, молекулы которых по своей пространственной и электронной структуре имитировали переходное состояние. Будучи введенными в клетки иммунной системы, такие антигены должны генерировать антитела, стабилизирующие переходное состояние соответствующей реакции и, следовательно, обладающие каталитическими свойствами подобно природным ферментам.

Хотя эта идея была высказана довольно давно,^{1,2} ее реализация вначале столкнулась с трудностями, так как в ответ на введение антигена клетки иммунной системы синтезируют большое количество антител («поликлональные антитела»). Трудности, возникающие при выделении из полученной сложной смеси близких по структуре белков антитела, обладающего наибольшей каталитической активностью и избирательностью, делали этот метод непригодным для практического использования.

Положение коренным образом изменилось, когда был открыт и детально разработан метод получения так называемых «моноклональных антител»,³ количество которых и разнообразие более ограничено. В этом случае действительно удалось выделить антитела, обладающие каталитическими свойствами.

Таким путем около 10 лет назад были синтезированы первые антитела, получившие название «каталитических антител» (КА) или «абзимов» (сокращение английского «antibody enzymes»).^{4,5} С тех пор эта область стремительно развивается. В настоящее время получено уже около сотни КА, способных ускорять и специфически направлять реакции самого различного типа, и сформулированы основные принципы, используемые при генерации КА заданной специфичности. Все КА были подвергнуты тщательному исследованию методами ферментативной кинетики. Их физико-химические характеристики оказались сходными с характеристиками природных ферментов.

В некоторых случаях активность КА приближалась к активности природных ферментов. Полученные КА обладали, как правило, высокой специфичностью, в том числе стереоселективностью, которая могла быть заранее задана. Кроме того, были получены КА, катализирующие реакции, для которых вообще неизвестны природные ферменты (например, для реакции Дильса–Альдера). Но наиболее важно и перспективно для синтетической химии то, что удалось получить КА, позволяющие изменить направление известной реакции и направить ее по пути, запрещенному энергетически в обычных некатализуемых условиях, иными словами, изменить хемо-, регио- и стереоспецифичность реакции и реализовать превращения, недоступные для обычных химических методов.

Таким образом, «каталитические антитела» представляют собой новое поколение биокатализаторов белковой природы, а их получение знаменует значительный шаг вперед в теоретическом и практическом аспектах науки о биокатализе.

В настоящем обзоре рассмотрена литература до 1997 г., основное внимание уделено химическому аспекту проблемы и тем возможностям, которые открывает использование КА для решения задач синтетической химии. Другие стороны этой проблемы, в частности, ферментативная кинетика КА и некоторые другие физико-химические вопросы, рассматриваются вкратце по мере необходимости при обсуждении специфичности действия КА, структуры их активного центра и механизма каталитического действия. Читатель, интересующийся этими вопросами, а также вопросами иммунохимии и молекулярной биологии каталитических антител, может обратиться к оригинальной литературе.

II. Основные принципы и техника получения каталитических антител

Принцип действия каталитических антител, как и обычных ферментов, состоит в облегчении формирования переходного состояния молекулы субстрата и создании благоприятных условий для его превращения в конечные продукты реакции. При этом барьер на энергетической координате реакции, возникающий при формировании переходного состояния, снижается и скорость реакции возрастает. Это — результат нескольких различных по природе взаимодействий, протекающих на активном центре фермента. Полость активного центра комплементарна пространственной структуре субстрата. На поверхности центра расположены активные группировки, стимулирующие соответствующие превращения молекулы субстрата. Пространственная и электронная комплементарность активного центра и субстрата способствуют «узнаванию» субстрата ферментом и образованию фермент-субстратного комплекса, а активные группировки обеспечивают переход молекул субстрата в

продукты реакции посредством кислотно-основного катализа, нуклеофильных или электрофильных взаимодействий и т.п.

При образовании фермент-субстратного комплекса подвижность молекулы субстрата ограничивается и она «замораживается» в наиболее благоприятной для дальнейшего превращения конформации. Таким образом достигается существенный выигрыш энергии и создается так называемая «энтропийная ловушка». Такой каталитический эффект особенно существен для бимолекулярных реакций, когда обе реагирующие молекулы фиксируются в выгодном для реакции взаимном положении. Существенную роль в проявлении каталитического эффекта играют и другие факторы, например, наличие в активном центре гидрофобных зон, облегчающих превращения субстрата в неполярной апротонной («неводной») среде.

Чтобы получить эффективное каталитическое антитело, необходимо наделить его активный центр свойствами, характерными для активного центра фермента (см. выше), и тем самым сделать возможным проявление каталитического действия.⁶ Этой цели служит антиген, в ответ на введение которого в процессе биосинтеза белковой молекулы в иммунном аппарате происходит формирование активного центра нужной структуры.

Антиген, используемый для получения КА, состоит из двух основных частей: низкомолекулярного гаптена и высокомолекулярного носителя (доступного природного белка). Гаптен является именно тем фрагментом молекулы антигена, который непосредственно формирует активный центр КА. По своему пространственному и электронному строению он должен соответствовать переходному состоянию, возникающему в процессе реакции, и обеспечивать появление у активного центра активных групп, гидрофобных зон и т.п.

Белковая же часть антигена (так называемый «иммуноген») представляет собой высокомолекулярный носитель, обеспечивающий генерацию в иммунном аппарате антител. В качестве белковой части антигена чаще всего используют доступные природные белки — гемоцианин моллюска *Megatona cremulata* (Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) или бычий сывороточный альбумин (BSA).

Правильный выбор гаптена является ключевым моментом, который и обеспечивает успех при получении КА. Естественно, что для правильного дизайна гаптена следует знать структуру переходного состояния, пути его возникновения и последующего распада. По сути дела — знать механизм реакции. В настоящее время удалось получить КА, катализирующие протекание многих реакций, различающихся своими механизмами. Однако дать общие рекомендации по дизайну гаптена, естественно, невозможно. Ниже для каждой конкретной реакции будут приведены соображения, послужившие основанием для выбора структуры гаптена.

Порою, при недостатке точных знаний о механизме реакции, подбор гаптена носит полуэмпирический характер. В этом случае большое значение имеет опыт и даже интуиция исследователя. Так, на начальных этапах значительную роль сыграло несколько упрощенное представление о соответствии пространственного и электронного строения гаптена структуре переходного состояния. Этого оказалось достаточно для получения первых эффективных КА. Примером может служить моделирование переходного состояния, возникающего при гидролизе сложноэфирной группировки, группировки фосфорной или фосфоновой кислоты (см. гл. III).

Гаптен, наряду с главной «реакционной частью», формирующей активный центр КА, должен содержать также фрагменты, обеспечивающие «узнавание» субстрата антителом. Это достигается включением в гаптен группировок, аналогичных группировкам субстрата. Кроме того, гаптен обяза-

тельно должен иметь группировку, позволяющую иммобилизовать его на белке, причем так, чтобы остаток гаптена находился в антигене на некотором расстоянии от белковой цепи. Такой группировкой, называемой «спейсером» или «линкером», может быть короткая алифатическая цепочка, содержащая на конце активную функциональную группу (например, карбоксильную). При иммобилизации карбоксильная группа спейсера реагирует, например, с аминогруппой остатка лизина белковой молекулы и привязывает к ней гаптен прочной амидной связью.

Иммобилизация гаптена на белке обычно протекает в мягких условиях, не затрагивающих ни гаптен, ни иммунный белок. Количество молекул гаптена, которые при этом связываются с молекулой белка, зависит от условий иммобилизации. Обычно при синтезе антигена стараются достигнуть привязки не менее 10–20 остатков гаптена на одну молекулу белка.

Полученный таким образом антиген используется для иммунизации животных — мышей чистых линий. Иммунизацию обычно проводят по стандартной методике;⁷ при получении конкретных КА различаются лишь отдельные детали. Как правило, осуществляют двух-трехкратную иммунизацию посредством внутримышечной инъекции в присутствии адъюванта (чаще всего адъюванта Фрейнда), а затем — одну внутривенную инъекцию без адъюванта для усиления иммунного ответа. По истечении определенного срока клетки селезенки иммунизированного животного используют для получения моноклональных антител в соответствии с классической гибридной технологией.⁸ Для этого клетки селезенки «сплавляют» с клетками миеломы в растворе полиэтиленгликоля. Сформированные таким образом гибридомы продуцируют моноклональные антитела, отвечающие различным фрагментам молекулы антигена. Из всей массы полученных моноклональных антител отбирают те, которые генерированы к структурным фрагментам гаптена и способны образовывать с ним комплекс (благодаря комплементарности их структур). Это достигается исследованием образовавшихся антител методом иммуноферментного анализа (enzyme linked immunosorbent assay — ELISA).⁹ В качестве реагента используют гаптен, иммобилизованный на BSA. Образование комплекса гаптена с антителом свидетельствует о комплементарности структуры активного центра антитела со структурой гаптена (и, следовательно, со структурой переходного состояния субстрата, которое моделировал данный гаптен). Можно ожидать, что такие антитела будут обладать каталитическими свойствами. Это проверяется далее прямыми экспериментами по способности отобранного антитела катализировать исследуемую реакцию.

Для получения каталитического антитела в количестве, необходимом для дальнейшего исследования, соответствующую гибридому, отобранную при ELISA-анализе, снова вводят мыши и выделяют целевое КА из асцитной жидкости, в которой оно содержится в высокой концентрации. Полученное КА очищают далее обычными приемами белковой химии (осаждение, хроматография и электрофорез).

Будучи белком, КА полностью теряет свою активность при термической обработке (денатурации), а также меняет ее при обработке типичными модификаторами белка (иод-ацетамидом, диэтилкарбонатом, тетраэтилметаном и др.).

Иногда для получения активных КА применяют более сложные специфические процедуры. Так, например, производится последовательная иммунизация мышей двумя антигенами, различающимися структурой гаптена (так называемая «гетерологическая иммунизация»)¹⁰ При этом у КА формируется активный центр, отвечающий особенностям обоих гаптенных, что придает КА нужную специфичность. В других случаях используют антиген, содержащий гаптен, который не только является стабильной моделью переходного состояния, возникающего при превращении субстрата,

но и сам вступает во взаимодействие с формирующимся активным центром КА, воссоздавая тем самым динамику превращения молекулы субстрата в процессе каталитической реакции (так называемая «реактивная иммунизация»).

По своим свойствам и поведению КА являются типичными белками, относящимися к классу иммуноглобулинов. Их физико-химические характеристики близки к характеристикам природных ферментов. Так, их поведение в каталитическом процессе подчиняется насыщающей кинетике и следует уравнению Михаэлиса – Ментен. Это свидетельствует о том, что в основе их каталитического действия лежит образование фермент-субстратного комплекса, что было непосредственно подтверждено масс-спектрометрическим исследованием.

Ингибирование действия КА гаптенем или его аналогом свидетельствует о том, что полость активного центра КА действительно комплементарна используемому для его генерации гаптену. Ингибиторный анализ КА широко применяется при исследовании строения активного центра КА и механизма его каталитического действия. Каталитический эффект количественно оценивается соотношением констант скорости катализируемой и некатализируемой (основной) реакций.

Важнейшей характеристикой КА является специфичность, в том числе стереоселективность. Для определения специфичности действия КА используют традиционный подход — изучают реакции структурных аналогов субстрата и определяют скорости их превращения и/или их ингибиторный эффект при катализе.

В нескольких случаях структура КА или его активного центра детально изучалась методом рентгеноструктурного анализа самого КА или его комплекса с субстратом. Такие исследования предпринимались главным образом для выяснения механизма действия КА на молекулярном уровне, для сравнения структуры и механизма действия КА и близкого природного фермента и для решения других вопросов энзимологии, где КА использовались в качестве моделей.

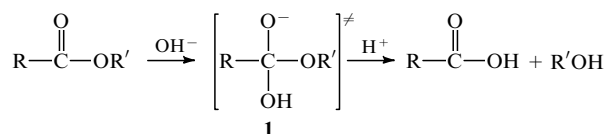
В последующих разделах обзора будут рассмотрены методы получения КА, катализирующих реакции различного типа, которые классифицированы по принципу, принятому в органической химии и наиболее привычному для химика-органика; при этом хронологический порядок может быть нарушен.

III. Гидролиз сложноэфирной связи и другие реакции трансацелирования

Гидролиз сложноэфирной связи — первый пример химического превращения, для которого были направленно получены каталитические антитела и рассмотрены принципы подбора гаптенных, являющихся «реакционной» частью искусственных антигенов, используемых для генерации специфических КА в процессе биосинтеза в иммунном аппарате животного.

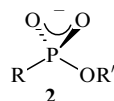
При получении этих КА успех был достигнут в первую очередь за счет правильного выбора группировки, которая имитировала в гаптене переходное состояние **1**, возникающее в процессе разрыва сложноэфирной связи (схема 1).

Схема 1



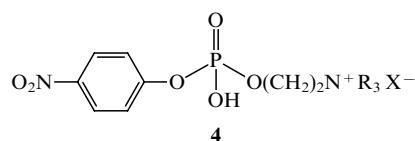
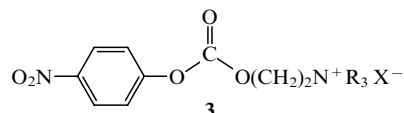
В качестве такой группировки была выбрана группировка $\text{RP}(\text{O})(\text{OR}')\text{O}^-$ (**2**) в производных фосфорной или фосфоновой кислот, содержащая тетраэдрический атом фосфора(V) и несущая отрицательный заряд, которая имитировала переходное состояние реакции распада сложноэфирной связи **1**,

содержащее тетраэдрический атом углерода и отрицательный заряд.^{4,5}



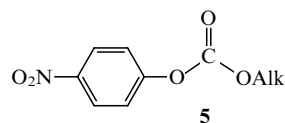
R = Ar, OAlk, OAr.

Идея использовать производные фосфорных или фосфоновых кислот возникла также из рассмотрения известных данных о структуре синтетических ингибиторов природных эстераз, в частности, холинэстераз.¹³ Эти ингибиторы являются фосфатными (или фосфонатными) аналогами соответствующих субстратов (например, ацетилхолина), в которых место сложноэфирной связи занимает фосфорсодержащая группировка. Они образуют комплексы с холинэстеразой, что свидетельствует о комплементарности фосфатной группировки с активным центром фермента. Оказалось, что некоторые антитела, полученные к ингибиторам этого типа, обладали каталитическими свойствами, т.е. ускоряли гидролиз сложноэфирной связи в соответствующем субстрате. Это подтверждало наличие в них активного центра, способствующего протеканию реакции гидролиза. Так, например, антитело MOPS 167,⁵ полученное к ингибитору эстеразы *O*-(4-нитрофенокси)карбонилхолина (**3**), образовывало комплекс с этим ингибитором — 4-нитрофенилфосфорилхолином (**4**) — и обладало заметным каталитическим эффектом, многократно ускоряя гидролиз производного холина **3**.

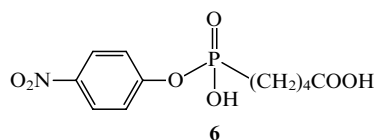


При этом антитело имело характеристики, типичные для природных эстераз (кинетика Михаэлиса – Ментен, ингибирование действием **4**, типичная зависимость активности от pH и т.д.). Его каталитическое действие отличалось региоспецифичностью: гидролиз аналогов субстрата **3** с измененной структурой алифатической цепи или не содержащих четвертичного атома азота ускорялся значительно слабее или вовсе не катализировался. Приведенные данные свидетельствуют о том, что фосфорсодержащая группировка удачно моделирует переходное состояние, возникающее при гидролизе сложноэфирной связи, и способна генерировать активный центр, образуя КА с эстеразным действием. Это и было в дальнейшем широко использовано для получения КА этого типа.

Так, для получения КА, катализирующего гидролиз 4-нитрофенилкарбоната (**5**),¹⁴ в качестве гаптена было использовано производное 4-нитрофенилфосфоната (**6**), содержащее спейсер — тетраметиленовый фрагмент с карбоксильной группой.[†]

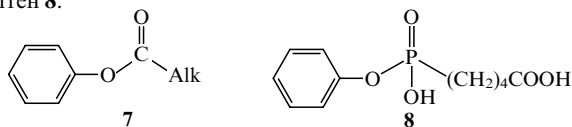


[†] Описание синтеза этого гаптена, также как других соединений, упомянутых в настоящем обзоре, см. в оригинальных статьях.

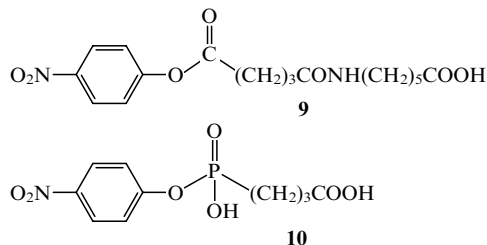


Иммобилизация фосфоната **6** на белке с помощью этой карбоксильной группы позволила получить искусственный антиген, содержащий в среднем 15 остатков гаптена на одну молекулу белка. Этот антиген был использован для иммунизации, в результате которой было выделено КА, ускоряющее гидролиз карбоната **5** в 800 раз по сравнению с некатализируемой реакцией. Полученное КА обладало характеристиками, типичными для эстеразы: кинетика гидролиза подчинялась уравнению Михаэлиса–Ментен (что указывало на образование фермент-субстратного комплекса), его активность имела характерную зависимость от pH, оно ингибировалось фосфатным аналогом субстрата — 4-нитрофенилфосфатом. Действие этого КА оказалось региоспецифичным: скорость гидролиза 3-метил-4-нитрофенилкарбоната была в 10 раз ниже, чем исходного соединения, а гидролиз изомерного 2-нитрофенилкарбоната не ускорялся вовсе.

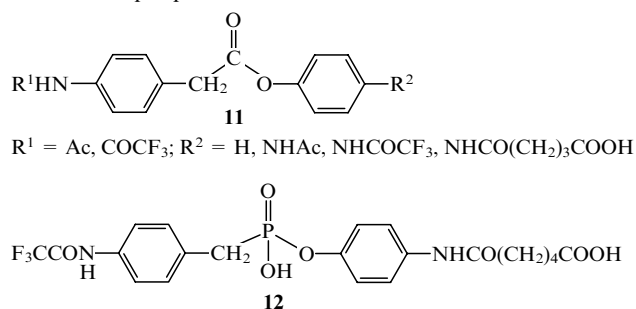
Аналогичные по структуре гаптены были использованы и для получения КА, катализирующих гидролиз сложных эфиров фенолов. Так, для генерирования КА, ускоряющего гидролиз простейших *O*-ацилфенолов типа **7**, был выбран гаптен **8**.



Одно из полученных КА ускоряло гидролиз ацилфенолов более чем в 10^4 раза.¹⁵ Для ускорения гидролиза сложноэфирной связи нитрофенолов **9**, ацилированных *N*-карбоксиалкильным производным полуамида глутаровой кислоты, были использованы КА к гаптену **10**, которые ускоряли гидролиз соединения **9** в 10^4 раз.¹⁶

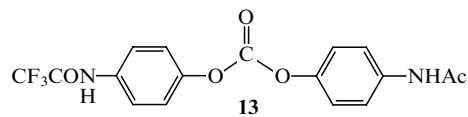


Для ускорения гидролиза несколько более сложных по структуре субстратов **11** — эфиров аминифенолов и замещенных аминифенилуксусных кислот — были получены КА с использованием фосфорсодержащих гаптенных производных бензилфосфоната **12**.¹⁷

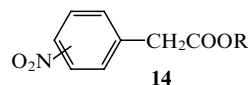


Производное бензилфосфоновой кислоты ближе по структуре к кислотной части субстрата, что позволяет более точно имитировать переходное состояние реакции гидролиза сложных эфиров **11**. Из смеси антител, полученных к гаптену **12**, было выделено несколько КА. Самое эффективное из них

ускоряло гидролиз эфиров **11** в 10^6 раз и обладало всеми характеристиками фермента. В частности, его активность изменялась после обработки специфическими модификаторами белка (диэтилкарбонатом, тетранитрометаном и др.). Активность этого КА сильно зависела от природы заместителей в ароматических ядрах субстрата **11**. Так, оно оказалось неактивно по отношению к гидролизу карбоната **13**, близкого по структуре к эфирам **11**.

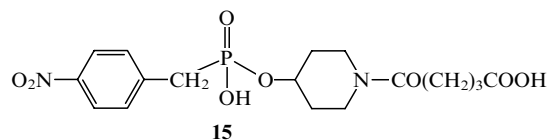


Вопрос о специфичности КА эстеразного типа имеет существенное значение для их практического использования при решении синтетических задач. Этот вопрос и факторы, определяющие специфичность, изучены на примере гидролиза эфиров нитрофенилуксусных кислот **14**.¹⁸



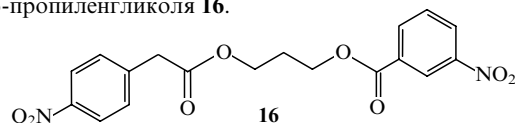
$R = \text{Alk}, \text{Bn}, \text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CH}_2, \text{ClC}_6\text{H}_4\text{CH}_2$ и др.

С этой целью был синтезирован гаптен **15**, содержащий остаток 4-гидроксипиперидина (для лучшей иммуногенности антигена) и спейсер.



Полученное к гаптену **15** каталитическое антитело обладало высокой эффективностью. Оно ускоряло гидролиз эфиров **14** в среднем в $3 \cdot 10^4$ раз. Результаты, полученные при изучении кинетики гидролиза эфиров **14** различной структуры, показали, что каталитический эффект имеет место только в случае 4-нитрозамещенных производных. Гидролиз соответствующих 3-нитропроизводных не ускоряется вовсе, что подтверждает установленную ранее закономерность.*

Используя эту закономерность, удалось, например, осуществить строго избирательный гидролиз смешанного эфира 1,3-пропиленгликоля **16**.

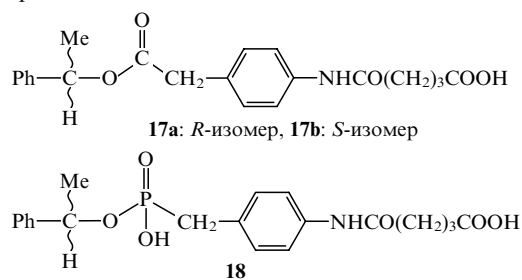


Влияние природы спиртовой компоненты значительно слабее кислотной. Так, гидролиз сложных эфиров **14**, содержащих остатки различных первичных спиртов, катализируется КА, хотя скорости гидролиза различаются в пределах от 10^4 до 10^6 . Напротив, гидролиз эфиров **14**, содержащих остатки вторичных спиртов, не ускоряется вовсе, за исключением производных 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ола.

Наиболее характерной и важной особенностью ферментативного катализа является его высокая стереоспецифичность. Этому вопросу при исследованиях КА уделялось очень большое внимание, и генерация первых КА с высокой стереоспецифичностью явилась серьезным достижением. Этот вопрос был впервые изучен при получении КА, катализирующего гидролиз сложных эфиров замещенной фенилуксусной кислоты и α -метилбензилового спирта **17**, содержащих асимметрический атом углерода.²⁰ Для генерации спе-

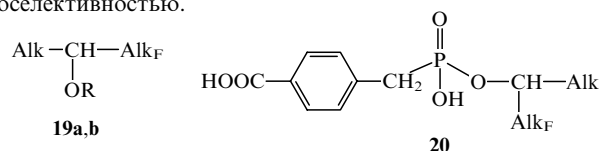
* Специфичность антител к нитрозамещенным субстратам была отмечена еще Ландштейнером¹⁹ на заре развития иммунохимии.

цифического КА использовали гаптен **18** — фосфонатный аналог субстрата **17**, содержащий асимметрический атом углерода.



Эфир **18** использовали в виде рацемата. На его основе было получено 11 активных КА, катализирующих гидролиз эфиров **17**. При изучении гидролиза чистых энантиомеров **17a** и **17b** в присутствии этих КА оказалось, что девять из них катализируют распад *R*-изомера, а два — распад *S*-изомера. Детальное исследование показало, что все КА обладают характеристиками типичных эстераз и отличаются высокой стереоселективностью действия: так, гидролиз энантиомера, соответствующего специфичности КА, проходит на 98%, в то время как гидролиз другого энантиомера — всего на 2%. При этом каталитическая активность стереоспецифических КА, расщепляющих *R*- и *S*-изомеры, различна. Каталитическое антитело, расщепляющее *R*-изомер, ускоряет реакцию в $8 \cdot 10^4$ раз, а КА, расщепляющее *S*-изомер — в $1.6 \cdot 10^3$ раза. Таким образом, рацемический гаптен **18** способен генерировать КА, обладающие двумя различными стереоспецифичностями, и каждый из энантиомеров **18** «штампует» активный центр КА с комплементарной ему пространственной структурой. Как уже отмечалось, количество образующихся при этом антител к тому и другому энантиомеру гаптена различно, что связано с особенностями биосинтеза белковой цепи в иммунном аппарате.

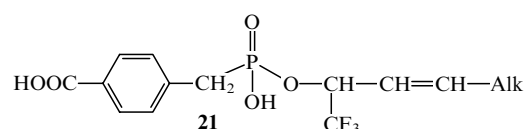
Различающиеся своей стереоспецифичностью КА могут быть выделены в индивидуальном виде или направленно получены с использованием соответствующего оптически чистого энантиомера гаптена. Такие КА, обладающие высокой стереоселективностью, успешно использованы в синтетической практике, например, для кинетического разделения смеси стереоизомерных спиртов посредством избирательного гидролиза их сложных эфиров. Так, например, было осуществлено разделение рацематов фторсодержащих спиртов **19a** ($R = H$) гидролизом их фенилацетатов **19b** ($R = COBn$).²¹ Используя энантиомеры гаптена **20** с *R*- и *S*-конфигурацией, генерировали КА с соответствующей стереоселективностью.



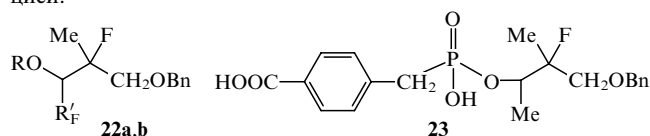
$R = H$ (**a**), $COBn$ (**b**);
 $Alk = C_6H_{13}, C_7H_{15}, C_8H_{17}$;
 $Alk_F = CHF_2, CF_3$.

Гидролиз рацемических фенилацетатов **19b** ($R = COBn$) в присутствии этих КА позволил получить *R*- и *S*-изомеры спиртов **19a** ($R = H$) с оптической чистотой 98%. Отметим, что длина алифатической цепи спирта не сказывалась на стереоселективности разделения.

Аналогично было осуществлено кинетическое разделение стереоизомерных спиртов, содержащих аллильную группу, **19a** ($Alk = CH=CHC_6H_{13}$). Каталитические антитела к энантиомерам гаптена **21** позволили получить из смеси фенилацетатов **19b** ($R = COBn$, $Alk = CH=CHC_6H_{13}$, $Alk_F = CF_3$) все четыре изомера соответствующих спиртов **19a** с высокой оптической чистотой.



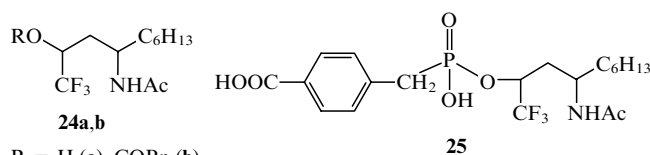
Для разделения диастереомерных спиртов **22a** ($R = H$) гидролизом их фенилацетатов **22b** ($R = COBn$) использовали КА, генерированные к гаптенам **23** с *син*- и *анти*-конфигурацией.²²



$R = H$ (**a**), $COBn$ (**b**).

Каталитические антитела к *син*-изомеру **23** гидролизывали *син*-изомер **22b** с оптической чистотой 99% (степень гидролиза 49%), а КА к *анти*-изомеру **23** со столь же высокой оптической чистотой гидролизывали *анти*-изомер **22b**. Так же селективно проходило разделение спиртов $HOCH(R_F)C(F)AlkCH_2OBn$, отличающихся от **22a** длиной алифатической цепи (Et -, Pr -, Bu -заместители вместо метильного). Оставшиеся в смеси негидролизовавшиеся диастереомеры фенилацетатов **22b** после отделения гидролизовавшихся изомеров превращали в спирты обычным гидролизом.

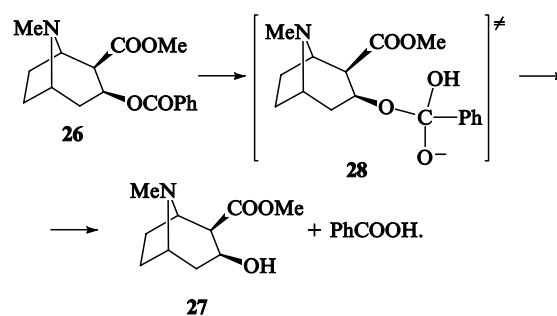
Сообщается о разделении всех четырех диастереомеров аминокислот **24a** из смеси их фенилацетатов **24b** с помощью набора КА, генерированных к диастереомерным гаптенам **25**.²²

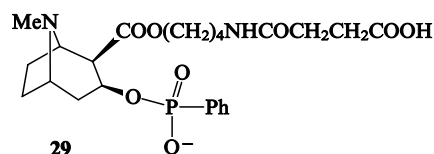


$R = H$ (**a**), $COBn$ (**b**).

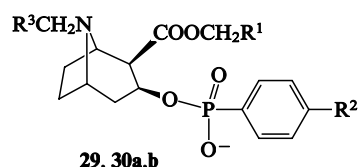
Предпринята попытка получить каталитическое антитело эстеразного типа, позволяющее эффективно расщепить один из опаснейших наркотиков — кокаин (**26**), и тем самым создать препарат, не просто связывающий кокаин, а разрушающий его на нетоксичные компоненты. Гидролиз кокаина (**26**) приводит к его распаду на нетоксичный метиловый эфир экгонина (**27**) и бензойную кислоту (схема 2). Гидролиз ускоряется природной бутирилхолинэстеразой, которая, однако, недостаточно активна. Для практического использования в клинике необходим гораздо более эффективный фермент. Учитывая, что гидролиз кокаина проходит через переходное состояние **28** и механизм этой реакции не отличается от других подобных реакций, при выборе гаптена руководствовались теми же принципами, т.е. для получения КА был использован гаптен **29** — аналог кокаина, содержащий остаток фенилфосфоновой кислоты вместо остатка бензойной кислоты и спейсер.²³

Схема 2





На основе этого гаптена были генерированы два КА, которые ускоряли гидролиз кокаина в 540 и 440 раз. Этого, к сожалению, оказалось недостаточно для их клинического использования. Была сделана попытка модифицировать гаптен, изменяя в нем место привязки спейсерной группировки. С этой целью были синтезированы гаптены **29**, **30a**, **b**.²⁴

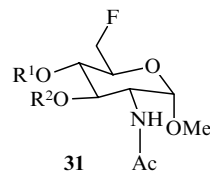


29: $R^1 = (CH_2)_3NHCOCH_2CH_2COOH$, $R^2 = R^3 = H$;
30a: $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = (CH_2)_3NHCOCH_2CH_2COOH$;
30b: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = (CH_2)_3NHCOCH_2CH_2COOH$.

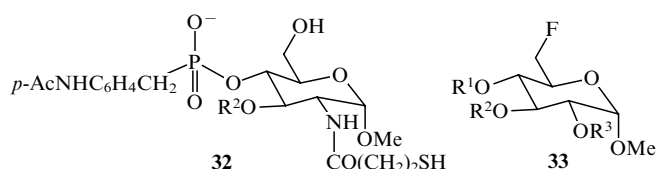
Полученные к ним КА имели высокую активность; наиболее эффективное из них ускоряло гидролиз кокаина в $2.3 \cdot 10^4$ раз. Однако это ускорение также недостаточно для создания лечебного препарата. Исследование ферментативной кинетики и ингибиторный анализ полученных КА указывают на большое различие в их активности и ее сложную зависимость от структуры белковых цепей антитела несмотря на их высокую гомогенность. Эти исследования открывают реальный путь к получению антинаркотиков, хотя для создания практически ценного препарата необходима еще работа по модификации полученных КА методами биотехнологии.

Каталитические антитела эстеразного типа, обладающие высокой региоспецифичностью действия, интересны также тем, что позволяют селективно удалять ацильные группы, различающиеся по своей структуре. Другой не менее важной задачей является селективное удаление одной из нескольких одинаковых по структуре ацильных групп, отличающихся своим положением в молекуле. Известны попытки получения КА с такой региоспецифичностью. Примером может служить генерирование КА для селективного удаления одной из ацильных группировок в полиацильном производном моносахарида,²⁵ что представляется полезным для решения сложных проблем синтетической химии углеводов.

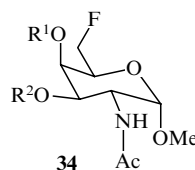
Для избирательного удаления 4-*O*-ацильной группы в 3,4-ди-*O*-ацильном производном глюкозы **31** ($R^1 = R^2 = COCH_2C_6H_4NHAc$) были получены КА с использованием гаптена **32** — структурного аналога субстрата **31**, в котором 4-*O*-ацильная группировка заменена на остаток бензилфосфоновой кислоты.



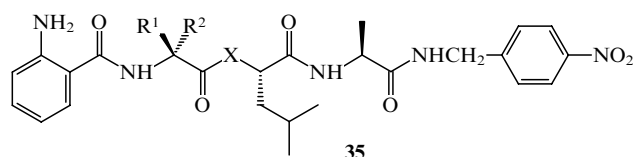
Соединение **32** содержит также в положении 2 спейсер, необходимый для иммобилизации. Одно из полученных КА региоселективно ускоряло (в 3000 раз) отщепление 4-*O*-ацильной группы в молекуле **31**. Соотношение продуктов 4-*O*-деацилирования и 3-*O*-деацилирования составляло 20 : 1, тогда как при обычном гидролизе в отсутствие КА оно было 4 : 1. При гидролизе в присутствии того же КА триацильного производного **33** ($R^1 = R^2 = R^3 = COCH_2C_6H_4NHAc$) соотношение продуктов 4-, 3- и 2-*O*-деацилирования составило 13 : 8 : 1.



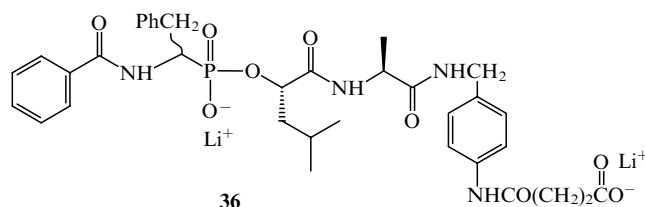
Наряду с высокой региоселективностью полученное КА обладало также высокой стереоселективностью: отщепление 4-*O*-ацильной группы в галактозном аналоге (**34**), в котором эта группа занимает аксиальное положение, в присутствии КА не ускорялось. Этот пример показывает, сколь сложные и тонкие вопросы могут быть в принципе решены с использованием КА, хотя данное КА для практического применения малопримочно.



Примером каталитического антитела с хемо-, регио- и стереоселективностью действия служит КА, селективно ускоряющее разрыв сложноэфирной связи в одном из диастереомеров депсипептида **35**.²⁶ Оно было генерировано с использованием гаптена **36** — фосфонатного аналога субстрата, представляющего собой примерно эквимолярную смесь диастереомеров.



$X = O, NH$; $R^1, R^2 = H, Bn$.

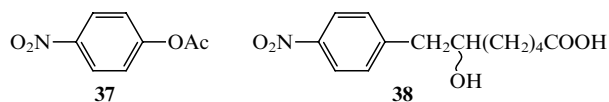


Полученное КА расщепляло только сложноэфирную связь ($X = O$), не затрагивая пептидной связи ($X = NH$) (хемоселективность), причем катализировало расщепление только депсипептида **35**, содержащего остатки D-фенилаланина, а депсипептид, содержащий L-изомер, расщеплялся не более чем на 0.5% (стереоселективность). О высокой региоспецифичности полученного КА свидетельствовал тот факт, что гидролиз аналогов депсипептида **35**, в которых остаток фенилаланина был заменен другой аминокислотой (лейцином или триптофаном), не ускорялся под действием данного КА.⁸

Все приведенные выше примеры получения КА основаны на использовании в качестве гаптенных, моделирующих переходное состояние реакции гидролиза сложноэфирной связи, аналогов субстратов, в которых эта связь заменена группировкой фосфорной или фосфоновой кислоты. Каталитические антитела к таким гаптенам обладали хемо-, регио- и стереоселективностью. Гаптены этого типа использовались в практической работе чаще всего и наиболее успешно.

§ О получении КА, катализирующих гидролиз эфиров карбаминной кислоты, см. в работах D.van Vranken, D.Panomitros, P.G.Schultz. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3873 (1994); P.Wentworth, A.Datta, S.Smith, A.Marshall, L.Partridge, G.M.Blackburn. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2315 (1997).

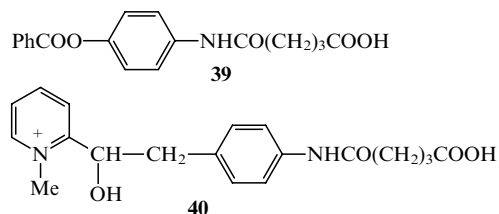
Однако для генерации КА, обладающих эстеразной активностью, могут быть применены также гаптены иной структуры, из которых наиболее известны гаптены, содержащие вместо сложноэфирной группировки субстрата вторичные спиртовые группы.¹ Хотя принцип действия такого гаптена не вполне ясен, тем не менее этим путем были получены некоторые активные КА. Впервые гаптен такого типа был сконструирован по аналогии с известным ингибитором протеазы, пепсина, — пепстатином.²⁸ Так, для получения КА, катализирующего гидролиз 4-нитрофенилкарбоната **5** или соответствующего ацетата **37**, в качестве гаптена была использована 7-(4-нитрофенил)-6-гидроксигептановая кислота (**38**).



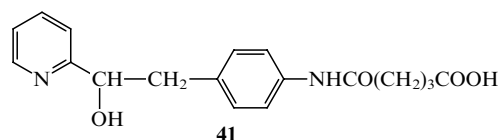
Кислота **38** содержит структурные элементы субстратов **5** и **37** и напоминает по строению фосфорсодержащий гаптен **6**, использованный для получения КА такого же действия (см. с. 1103).

Полученное к кислоте **38** каталитическое антитело ускорило гидролиз сложных эфиров **5** и **37** в 930 и 1225 раз соответственно. Это КА проявляло все типичные свойства эстераз, и хотя его активность была существенно ниже, чем активность КА, генерированного к фосфорсодержащему гаптену **6**, тем не менее это доказывало возможность моделирования переходного состояния реакции гидролиза группировки вторичного спирта.

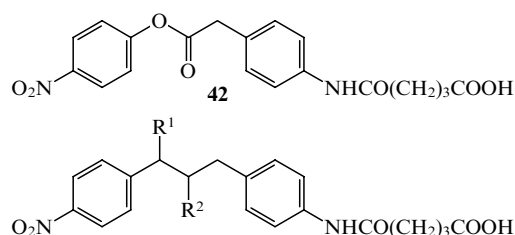
Более успешным оказалось применение гаптенных, содержащих наряду с вторичной спиртовой группой группировку, несущую положительный заряд.²⁹ Так, например, для получения КА, катализирующего разрыв сложноэфирной связи в бензоате **39**, был использован гаптен **40**.



Предполагалось, что положительный заряд *N*-метилпиридиния генерирует в надлежащем месте активного центра антитела кислотную группу (предположительно карбоксильную), а тетраэдрический атом вторичной спиртовой группировки обеспечивает формирование его пространственной структуры. Генерированное к гаптену **40** каталитическое антитело оказалось высокоэффективным и приближалось по активности к природным эстеразам. Оно ускоряло гидролиз бензоата **39** в 10^6 раз. Авторы объясняют это тем, что гаптен **40** не только формировал пространственную структуру активного центра КА, но и обеспечивал в нем генерацию карбоксильной группы, которая способствовала превращению субстрата за счет общего кислотно-основного катализа. Присутствие карбоксильной группы в КА и ее роль в процессе расщепления сложноэфирной связи косвенно подтверждается тем, что пиридиновый аналог соединения **40** — гаптен **41**, лишенный положительного заряда, не приводит к образованию активного КА.



Таким образом, для получения эффективных КА важно не только формирование активного центра, комплементарного переходному состоянию, но и генерация в нем группировок, способствующих самому процессу превращения переходного состояния в продукты реакции, например, за счет общего кислотно-основного катализа. Эти выводы были подтверждены³⁰ при исследовании гидролиза сложноэфирной связи в соединении **42** под действием КА, генерированных к гаптенам типа **43**, которые ускоряли гидролиз сложных эфиров в $3 \cdot 10^3$ раз.



43a: $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = \text{OH}$;

43b: $R^1 = \text{N}^+\text{Alk}_3$, $R^2 = \text{OH}$;

43c: $R^1 = \text{N}^+\text{Alk}_3$, $R^2 = \text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

Подробное исследование КА, генерированных к различным заместителям гаптенных **43a–c**, методами ферментативной кинетики и особенно ингибиторного анализа, позволили сделать важный вывод: отсутствие каталитической активности у КА объясняется не только недостаточным связыванием субстрата (за счет недостаточной комплементарности активного центра), но и в еще большей степени — местоположением в активном центре группировок, обеспечивающих динамику распада переходного состояния на продукты реакции. Так, число активных КА, полученных на основе гаптена **43a**, содержащего аминогруппу (она фактически функционирует в виде H_3N^+ -группы), больше, чем число КА, образующихся при использовании гаптена **43b**, несущего более объемистую группировку Alk_3N^+ , так как она затрудняет подход к положительно заряженному центру гаптена и, следовательно, карбоксильная группа в нужном месте формирующегося активного центра не образуется. Наличие в гаптене **43c** дополнительной заряженной фосфорной группировки также нарушает формирование активного центра, что приводит к менее активным КА. Таким образом, по мнению авторов,³⁰ активность КА, генерированных к гаптенам **43a–c**, зависит в первую очередь от взаимного расположения заряженных группировок в 1,2-аминоспиртовой части молекулы. Это необходимо учитывать при дизайне гаптенных для проектирования высокоэффективных КА.

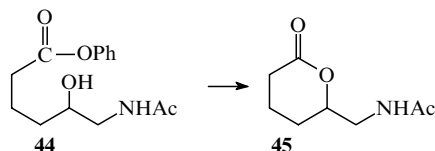
Предприняты попытки путем химической модификации или методом направленного мутагенеза ввести в полученные КА группировки, способствующие повышению его эффективности (что широко используется для природных ферментов). Примером такого модифицирования КА может служить введение в активный центр антитела MOPS 315 с эстеразной активностью остатка имидазола, привязанного ковалентной связью.³¹ Такая модификация повышала активность КА в 10^3 раз по сравнению с эффектом, наблюдавшимся при простом добавлении имидазола в реакционную среду в той же реакции гидролиза.

Все приведенные выше примеры относятся к получению КА, катализирующих простейшую реакцию трансацелиро-

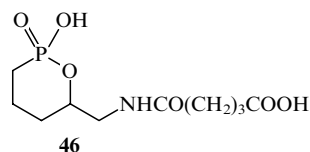
[¶] О попытках использования для получения КА эстеразного типа гаптенных другой структуры, например, содержащих вместо эфирного атома кислорода изостерную и изоэлектронную CF_2 -группу, см. работу²⁷.

вания — гидролиз сложного эфира, при котором ацильная группа переносится на молекулу воды, присутствующей в огромном избытке. Данная реакция имеет псевдопервый порядок. Реакции *O*-трансацилирования в более широком смысле слова предполагают перенос ацильного остатка на любое гидроксилсодержащее соединение и отличаются более сложным механизмом.

Простейшим примером *O*-трансацилирования служит реакция внутримолекулярного переноса ацильной группировки в фениловом эфире гидроксикислоты **44** на гидроксильную группу, приводящая к образованию лактона **45**.³²



Для получения КА, катализирующего данную реакцию, был использован гаптен **46**, являющийся фосфорным аналогом лактона **45**. Подобно другим гаптенам, примененным для генерации КА эстеразного типа, фосфонат **46**, использованный в виде одного из энантиомеров, моделировал переходное состояние, возникающее при лактонизации эфира **44**. Полученное КА ускорило реакцию в 167 раз по сравнению с некатализируемой реакцией и следовало кинетике Михаэлиса — Ментен. Реакция протекала с высокой стереоселективностью.

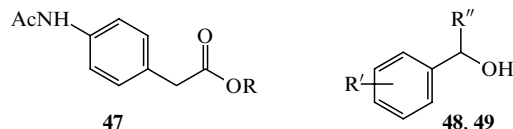


Циклизация рацемического эфира **44** останавливалась после превращения 50% субстрата, при этом образовывался только один из стереоизомеров лактона **45**, так как превращению подвергался только один из энантиомеров **44**. Второй энантиомер в реакцию не вступал. Таким образом, использованный энантиомер гаптена **46** формирует активный центр КА, комплементарный лишь одному из энантиомеров субстрата. Данное КА может рассматриваться одновременно как фермент, способствующий образованию новой сложноэфирной (лактонной) связи, и его можно отнести к классу синтетаз.

Наряду с КА, катализирующими внутримолекулярный перенос ацильной группы в одном субстрате, были получены также КА трансферазного типа, способствующие межмолекулярному переносу ацильных групп с одного субстрата на другой. Особый интерес представляли реакции, протекающие в водной среде, т.е. в присутствии большого избытка конкурирующего акцептора — воды. Получение и исследование КА, катализирующих такие реакции, было предпринято главным образом с целью изучения механизма реакции; их практический аспект для решения задач органического синтеза исследовался мало. Сложность катализа подобных двухсубстратных реакций состоит в том, что они могут протекать по двум принципиально различным механизмам: через образование тройного комплекса (КА + субстрат 1 + субстрат 2) или протекать более сложно через несколько стадий. Проведение таких реакций в водной среде дополнительно предполагает образование в КА активного центра, способного «вытаскивать» из сферы реакции конкурирующую молекулу воды, например, за счет присутствия в нем гидрофобных группировок. Это свойство должно быть заложено в строении гаптена, моделирующего переходное состояние.

Проведено детальное исследование одной из таких реакций — избирательный перенос остатка 4-ацетиламинофенил-

уксусной кислоты из различных ее эфиров **47** на замещенные бензиловые (**48**) и α -метилбензиловые спирты (**49**) в среде вода — ДМСО (10 : 1).³³



R = Alk, Ar, Bn, CH₂=CH.

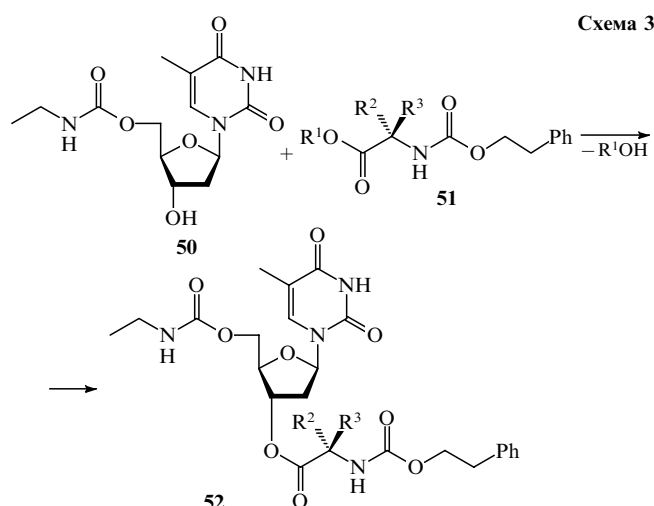
48: R' = H, **49:** R' = Me.

Соответствующее КА было генерировано с использованием гаптена **18**. Оказалось, что оно достаточно эффективно катализирует перенос ацильного остатка не только на молекулу воды (гидролиз) (см. с. 1104), но и на спирты. Причем этот процесс происходит избирательно и не сопровождается гидролизом эфира **47**, несмотря на присутствие большого избытка воды. Трансацилирование эффективно проходит при сочетании различных доноров (R = Alk, CH=CH₂, Ar, Bn) ацильного остатка **47** и акцепторов (R') — спиртов **48** и **49**, делая процесс эффективнее в 10⁴–10⁶ раз, в том числе и в случае вторичных спиртов **49**, содержащих гораздо более стерически затрудненную гидроксильную группу, чем гидроксильная группа воды. Интересно, что одним из доноров ацильного остатка **47** был виниловый эфир, который оказался эффективным и удобным. Это связано с тем, что выделяющийся при трансацилировании виниловый спирт изомеризуется в ацетальдегид и удаляется из сферы реакции.

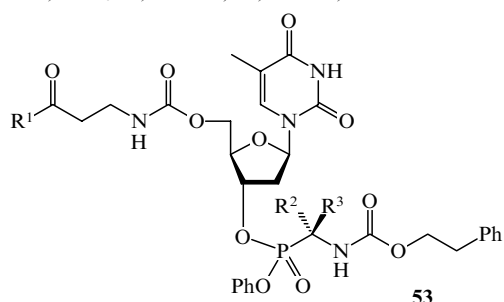
Подробное исследование каталитического действия КА, полученного на основе гаптена **18**, методами ферментативной кинетики и ингибиторного анализа, а также рентгеноструктурный анализ некоторых комплексов КА с субстратами позволили сделать важные выводы о механизме подобных двухсубстратных реакций трансацилирования. Вкратце они сводятся к следующему.^{34, 35} Реакция переноса ацильного остатка от эфира **47** к спирту проходит через промежуточное образование ацильного производного КА. Последующий перенос ацильной группы на спирт-акцептор проходит согласно с так называемой «пинг-понговой» кинетикой, когда вхождение в активный центр КА первого субстрата (сложного эфира), удаление уходящей группы (сопровождающееся образованием ацильного производного КА), вхождение второго субстрата (акцептора ацильной группы) и отщепление продукта трансацилирования (сопровождающееся освобождением катализатора — КА) закономерно чередуются. Затем вся последовательность повторяется. Активный центр КА в ходе всего процесса испытывает определенные конформационные изменения в соответствии со структурой второго субстрата реакции. О молекулярном механизме ацильного переноса см. в работах^{36, 37}.

Реакции ацильного переноса, катализируемые природными трансферазами, широко представлены в биохимических процессах, протекающих в живом организме. В этой связи представляет интерес получение КА, катализирующего одну из важнейших реакций такого рода — реакцию аминокислотирования (перенос остатка аминокислоты на остаток нуклеотида), которая в клетке протекает под действием природного фермента — аминокислот-т-РНК-синтетазы — и является ключевой стадией биосинтеза белка.

Была изучена³⁸ реакция переноса на гидроксильную группу производного тимидина **50** остатка *N*-ацетилаланина из эфира **51**, приводящая к производному **52** (схема 3). Соответствующее КА было генерировано к гаптену **53**, который является фосфатным аналогом продукта аминокислотирования **52**. Такая структура гаптена стимулирует образование активного центра КА, который обеспечивает взаимовыгодное расположение субстратов реакции и способствует энтропийному выигрышу при формировании переходного состояния этой бимолекулярной реакции. При



$R^1 = \text{Ph}, 4\text{-FC}_6\text{H}_4, \text{CH}_2\text{CN}; R^2, R^3 = \text{H}, \text{Me}.$



$R^2, R^3 = \text{H}, \text{Me}.$

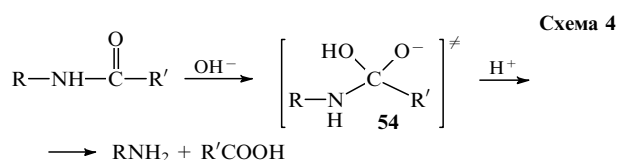
этом тетраэдрическое строение фосфонатной группировки отличается от тригональной структуры продукта реакции, что исключает ингибирование процесса аминоацилирования продуктами реакции.

Реакция аминоацилирования тимидина **50** протекала в случае фениловых ($R^1 = \text{Ph}$), 4-фторфениловых ($R^1 = 4\text{-FC}_6\text{H}_4$) и цианметилловых ($R^1 = \text{CH}_2\text{CN}$) эфиров **51**, но не имела места для этиловых ($R^1 = \text{C}_2\text{H}_5$) эфиров **51**. Из полученных к гаптenu **53** антители четыре катализировали реакцию переэтерификации эфиров L-аланина, а три — реакцию переэтерификации эфиров D-аланина. Наиболее активное из полученных КА ускорило реакцию аминоацилирования более чем в 10^8 раз. Кинетический анализ показал, что полученные КА относительно мало различают спиртовую компоненту эфира и более избирательны к стереохимии субстрата, т.е. реакция очень стереоспецифична.

IV. Гидролиз и образование амидной связи

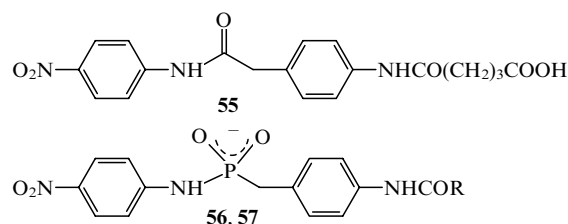
Поиск КА, способных катализировать гидролитический разрыв амидной связи, подобно тому как это делают природные протеолитические ферменты, представляет большой интерес, так как это открывает новые возможности для избирательного гидролиза полипептидной цепи белковой молекулы (одна из центральных проблем биоорганической химии). Эта задача оказалась более трудной, чем гидролиз сложноэфирной связи, и успехи в этом направлении гораздо скромнее. Дело в том, что разрыв связи $\text{NH}-\text{CO}$ — более энергоемкий процесс, протекающий по более сложному механизму, поэтому для создания КА, понижающего энергетический барьер этой реакции, требуется более тщательный подбор гаптена, инициирующего биосинтез КА с высокой и специфической активностью. К настоящему времени удалось получить КА, достаточно эффективно катализирующие гидролиз лишь простейших амидов.

Гидролиз амидной связи протекает через переходное состояние **54**, которое далее распадается на амин и кислоту (схема 4).



Каталитическое антители должно стабилизировать ионный центр в переходном состоянии **54** и одновременно способствовать протонированию атома азота при отщеплении амина. В качестве гаптена, моделирующего переходное состояние **54** и формирующего активный центр КА, были использованы аналоги амидов, в которых место амидной связи занимает стерически и электронно сходная фосфамидная связь.

Так, например, для катализа гидролитического расщепления 4-нитроанилидов фенилуксусных кислот **55** были получены КА, генерированные к гаптenu **56**.

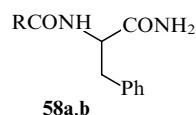


$R = (\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ (**56**), Me (**57**).

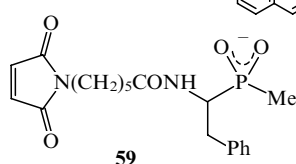
Гаптен **56** содержал фосфоамидную группу и функциональные группировки, аналогичные группировкам субстрата **55**, необходимые для его «узнавания», а также спейсер для иммобилизации.³⁹ Наиболее активное из полученных КА ускорило гидролиз амида **55** при pH 9 в $2.5 \cdot 10^5$ раз по сравнению с некатализируемой реакцией и имело характеристики, типичные для природных амидаз (кинетика Михаэлиса–Ментен, ингибирование фосфоамидом **57** — аналогом гаптена **56**, и т.д.). Действие КА отличалось высокой специфичностью: гидролиз 2- и 3-нитроанилидов в отличие от 4-нитроанилида **55** не катализировался. Подобная специфичность наблюдалась и для КА эстеразного типа (см. гл. III). Наиболее существенной была узкая специфичность КА к ацильной части субстрата.

К сожалению, гидролиз 4-нитроанилидов различных α -аминокислот, а также некоторых ди- и трипептидов не катализировался с помощью полученных КА, и они не смогли быть использованы для каталитического гидролиза пептидной связи.

Удалось получить КА, катализирующее гидролиз простейших незамещенных амидов *N*-ацилированных фенилаланинов **58**. Соответствующее КА было генерировано с использованием гаптена **59** — аналога амидов **58**, в котором место карбоксамидной группы занимал остаток метилфосфиновой кислоты, а алкильный спейсер имел на конце остаток малеимида, необходимый для иммобилизации.⁴⁰



$R = \text{Me}$ (**a**), $(\text{CH}_2)_5\text{NHSO}_2$ (b)



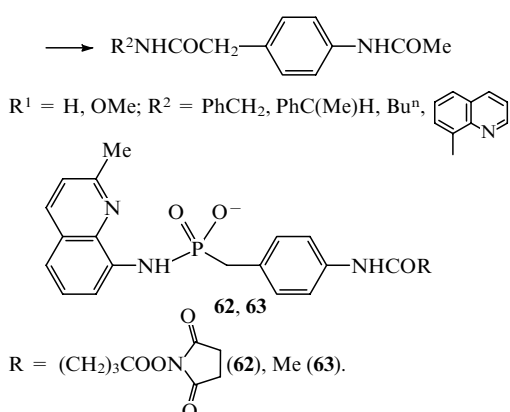
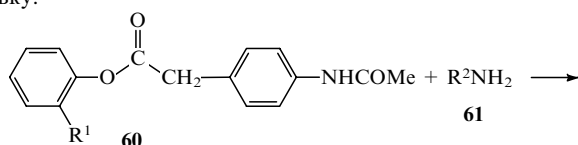
Полученное КА ускорило гидролиз амида **58b** всего в 130 раз, причем каталитическое действие проявлялось только по

отношению к производным D-фенилаланина. Данное КА не обладало эстеразной активностью. Высокая региоспецифичность КА проявлялась в том, что ускорялся гидролиз только незамещенной амидной группы, а ациламидная связь в амидах **58a,b** не затрагивалась. Узкая специфичность этого КА мешала его практическому использованию, но оказалась полезной при изучении механизма реакции ацильного переноса (см. с. 1107).

Для получения КА, катализирующих разрыв пептидных связей, был использован и другой подход. Учитывая то, что многие природные пептидазы являются металлоферментами (их активный центр включает ион металла), для генерации эффективного КА пептидазного типа было предложено использовать в качестве гаптена комплекс амида, содержащего ион металла с соответствующим лигандом. Предполагалось, что такой сложный гаптен будет формировать полость активного центра, в которой разместится амидная связь субстрата, координирующая ион металла. Примером такого подхода явилась попытка получить КА, избирательно гидролизующего пептидную связь глицилфенилаланина.⁴¹ Для получения КА был использован гаптен, который наряду с остатком субстрата содержал триеновый комплекс кобальта(IV). Одно из генерированных к нему КА оказалось активным и обладало некоторой специфичностью к структуре пептида. К сожалению, эта работа не получила, по видимому, продолжения и до практического применения этого КА дело не дошло. Однако принципиальное значение использования сложных металлокомплексов в качестве гаптен неоспоримо.

Не меньший интерес, чем разрыв амидной связи, катализируемый КА, представляет собой и обратный процесс — каталитический синтез этой связи (особенно эффективный и избирательный синтез пептидной связи в достаточно мягких условиях). Хотя известно значительное количество природных ферментов, катализирующих эту реакцию, интерес к получению КА с заранее запланированной специфичностью вполне оправдан.

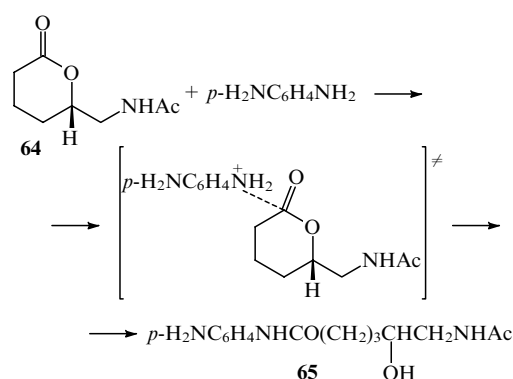
В основе химических методов формирования амидной связи лежит аминолиз какого-либо производного карбоновой кислоты, т.е. перенос ацильного остатка на амин. Функция КА сводится к облегчению этого переноса. По существу, действие КА такого типа близко к действию КА эстеразного типа, катализирующего перенос ацильной группы на молекулу воды. Существенным различием, однако, является то, что в этом случае амин присутствует в концентрации, сравнимой с концентрацией ацил-донора. Реакция фактически имеет второй порядок и протекает по более сложному механизму, который может включать образование промежуточного переносчика ацильной группы — ацилированного производного КА (ср. гл. III).^{34–37} Это должно найти отражение при дизайне гаптена, моделирующего переходное состояние, возникающее при синтезе пептидной связи. В качестве модельной была выбрана простейшая реакция аминолиза — прямая атака нуклеофильного атома азота на сложноэфирную связь (аналогичная по переходному состоянию гидролизу сложного эфира или амидной связи). Переходное состояние моделировалось гаптеном — аналогом субстрата, в котором место сложноэфирной связи занимала фосфамидная связь. Так, для получения КА, катализирующего реакцию аминолиза ариловых эфиров замещенных фенилуксусных кислот **60** аминами **61**, в частности, бензиламином, в качестве гаптена было использовано производное 8-аминохинолина **62**, содержащее фосфонамидную группировку.⁴²



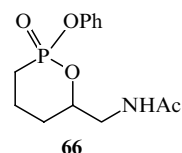
Полученное КА заметно ускоряло реакцию аминолиза, подчинялось кинетике Михаэлиса – Ментен по обоим компонентам реакции (подобно природным ферментам) и ингибировалось аналогом гаптена — соединением **63**. Действие КА отличалось специфичностью по отношению к структуре амина, что было установлено с помощью конкурентных реакций; соотношение скоростей аминолиза 8-аминохинолина, бензиламина и бутиламина в присутствии КА составляло 30:3.12:1, тогда как в отсутствие КА влияние структуры амина почти не сказывалось на скорости реакции (соотношение 0.9:0.7:1). Реакция в присутствии КА протекает стереоселективно: скорости аминолиза эфира **60** эпимерами α -метилбензиламина различались ($R:S = 2.2:1$).

Аналогично было получено КА, катализирующее аминолиз лактона **64** *n*-фенилендиамином (схема 5). В результате этой реакции происходит раскрытие цикла и образуется аминокислота **65**.⁴³

Схема 5

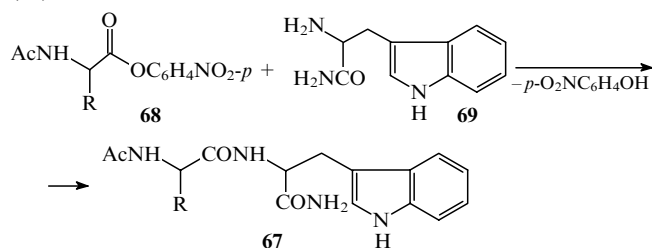


Каталитическое антитело, генерированное к гаптену **66**, — фосфонатному аналогу лактона **64**, увеличивало скорость реакции в несколько раз и действовало стереоспецифично, ускоряя аминолиз только (–)-эпимера лактона **64**.

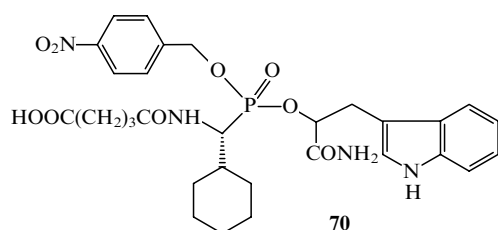


Вначале эти исследования имели существенное значение при сравнении механизма действия КА в сходных реакциях гидролиза и аминолиза (ср. гл. III),^{34–37} но не представляли интереса для синтетической химии. Однако в последнее время они вновь привлекли внимание исследователей. Дело в том, что создание эффективных катализаторов, позволяющих избирательно формировать пептидную связь, может облегчить решение важной проблемы — синтеза крупных белков посредством направленного сшивания пептидных блоков, которые в настоящее время стали легкодоступными благодаря синтезу их на твердых носителях. Уже сделаны

первые шаги, направленные на получение КА, напоминающих по своему действию природные ферменты — лигазы. Используя в качестве гаптена, моделирующего переходное состояние, соответствующие фосфорсодержащие аналоги, удалось получить первые КА, катализирующие образование пептидной связи между аминокислотами. Так, для получения КА, эффективного при синтезе дипептида **67**,⁴⁴ образующегося при конденсации *n*-нитрофенилового эфира соответствующей *N*-ацетиламинокислоты **68** с амидом триптофана (**69**), был использован гаптен **70**.[†]



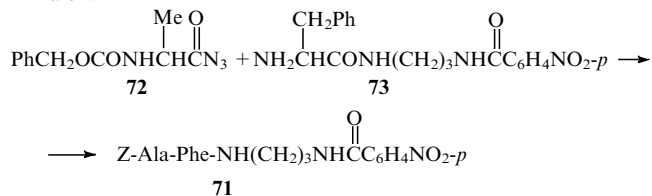
R = Prⁱ, Buⁱ, CH₂Ph.



Соединение **70** является фосфонатным аналогом пептида **67** и содержит все его характерные группировки. Причем *n*-нитробензильный остаток, по мнению авторов,⁴⁴ облегчает удаление отщепляющегося *n*-нитрофенола из активного центра КА при реакции конденсации, а циклогексильный остаток моделирует алифатическую цепь α-аминокислоты.

Были получены два КА примерно равной эффективности, которые ускоряли реакцию образования пептида AcVal—Trp в 220 раз, AcIle—Trp в 380 раз и AcPhe—Trp более чем в 1000 раз по сравнению с реакцией, проводимой в отсутствие КА. Таким образом, КА обладали достаточно широкой специфичностью, что существенно для их синтетического использования.[‡] Важным преимуществом проведения реакции конденсации в присутствии КА является очень незначительная рацемизация исходных аминокислот (0–4%), тогда как в некатализируемой реакции она достигает 25%. Интересно, что на эффективность КА конфигурация аминокислоты влияет относительно мало.

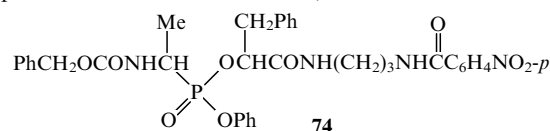
Аналогичным образом было получено КА, катализирующее образование производного дипептида аланилфенилаланина **71**.⁴⁶



Пептидил-донором в реакции конденсации служил азид L- или D-аланина (**72**), *N*-конец которого был защищен бензилоксикарбонильной группой. Азид получали *in situ* из соответствующего фенилового эфира при добавлении в реакционную среду азидата натрия. Акцептором служила

аминогруппа фенилаланина, *C*-конец которого был защищен в виде амида *N*-(4-нитробензоил)-1,3-диаминопропана.

В качестве гаптена был выбран фосфонатный аналог синтезируемого дипептида **71**, содержащий защитные группировки исходных аминокислот, — соединение **74**.



Полученное КА ускоряло реакцию конденсации производных аминокислот **72** и **73** в 10⁴ раза по сравнению с некатализируемой реакцией. При этом действие КА отличалось стереоселективностью — реакция с производным L-аланина протекала в 7 раз быстрее, чем с D-изомером.

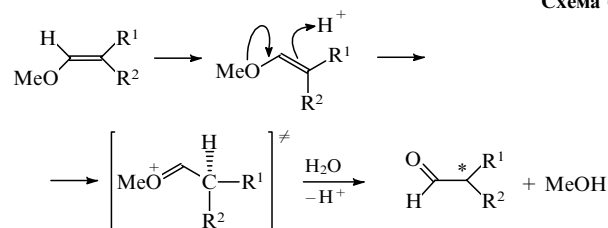
Работы^{44–46} представляют большой интерес, так как их можно рассматривать как первые шаги на пути к синтезу белков путем сшивания пептидных фрагментов.[§]

V. Гидролитический разрыв углерод-кислородной связи в эфирах енолов и ацеталей

Значительное количество работ посвящено получению и исследованию КА, катализирующих гидролитический разрыв C—O-связи в эфирах енолов и ацеталей, который приводит к регенерации родоначальных карбонильных соединений. Эти реакции, проходящие по сходному механизму, встречаются во многих синтетических схемах. Повышение их эффективности и избирательности, в особенности стереоселективности, будет способствовать решению многих задач синтетической химии.

Простейшим примером реакции расщепления эфиров енолов является гидролитическое расщепление алкилвиниловых эфиров с регенерацией соответствующего альдегида или кетона (схема 6). Эта реакция проходит в присутствии кислотного катализатора.

Схема 6



Стадией, контролирующей кинетику, является протонирование по β-углеродному атому винильной группировки эфира. Если β-углеродный атом винилового эфира прохирален (R¹ ≠ R²), то в результате реакции может образоваться смесь двух стереоизомеров. Стереохимический результат реакции важен для ее синтетического использования, в частности, при асимметрическом синтезе.

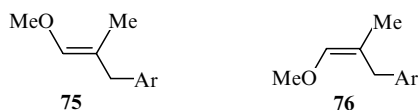
Обычно гидролиз *O*-алкиленолов протекает в относительно жестких условиях и с умеренной стереоселективностью. Поэтому получение КА, способных в мягких условиях и с хорошим стереохимическим контролем катализировать это превращение, представляет существенный интерес. Такие КА должны способствовать возникновению в субстрате оксониевого центра и облегчать протонирование β-углеродного атома, сопровождающееся его *sp*³-гибридизацией («пирамидизацией»), причем пространственное направление атаки протона и будет определять энантиоселективность реакции.

[†] Авторы предпочли гаптен **70** с P—O-связью вместо более труднодоступного фосфамидного аналога.

[‡] В работе⁴⁵ описано использование одного из этих КА для синтеза три- и тетрапептидов.

[§] О получении КА, катализирующих перегруппировку пептидной связи в аспартилглицине, см. в работе⁴⁷.

В работе⁴⁸ описано получение КА, катализирующих гидролиз виниловых эфиров **75** и **76**.



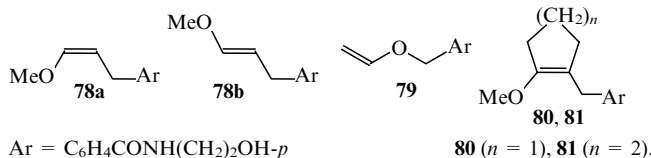
Ar = C₆H₄CONH(CH₂)₃OH

В качестве гаптен⁴⁹ были использованы производные N,N-диалкилпиперидиния **77**.



Положительный заряд на атоме азота в гаптене **77** должен генерировать в активном центре КА образование отрицательно заряженной группы, обеспечивающей формирование оксониевого центра и протонирование субстрата. В свою очередь тетраэдрическая структура атома азота должна стимулировать образование в активном центре полости, облегчающей переход β-углеродного атома в пирамидальное состояние. Заместитель у атома C(3) пиперидинового кольца стабилизирует конформацию цикла в молекуле **77** и служит линкером, необходимым для привязки гаптена к белку при иммобилизации.

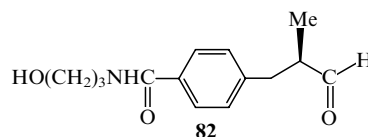
Для изучения зависимости эффективности и стереоселективности действия КА было синтезировано несколько гаптен⁴⁹, различающихся природой и пространственным расположением заместителей у атома азота (R¹ и R² = H, Me, CH₂Ar). Ко всем гаптенам были получены активные КА. Для подробного изучения было выбрано одно из них — 14 D9, генерированное к гаптене **77** (R¹ = Me, R² = CH₂Ar). Оно обладало всеми типичными характеристиками фермента и проявляло достаточно высокую эффективность, которая в значительной мере зависела от строения субстрата. Так, в сравнимых условиях (при pH 6) гидролиз *транс*-изомера **75** ускорялся в присутствии КА в 2500 раз, а *цис*-изомера **76** — в 290 раз. Дальнейшие исследования этого КА показали,⁴⁹ что оно обладает широкой субстратной специфичностью, хотя его эффективность невысока и очень сильно варьирует. Так, гидролиз виниловых эфиров **78**, не содержащих алкильных β-заместителей, ускорялся в 180 раз, а винилового эфира **79** — всего в 110 раз. Напротив, каталитическое антитело 14 D9 проявляло высокую активность при гидролизе циклических виниловых эфиров, ускоряя гидролиз производного метоксициклопентена **80** в 12 500 раз, а производного метоксициклогексена **81** в 370 раз.



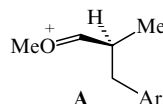
Ar = C₆H₄CONH(CH₂)₃OH-*p*

80 (n = 1), **81** (n = 2).

Наиболее важным свойством данного КА оказалась его высокая энантиоселективность. Так, гидролиз виниловых эфиров **75** и **76** в его присутствии в обоих случаях дает один и тот же S-энантиомер альдегида **82** с очень высокой энантиоселективностью (93–96% ee).[¶]



Такая же высокая энантиоселективность проявляется и при гидролизе циклического винилового эфира **80**, который в присутствии этого КА дает циклический кетон с 93% ee. Столь высокая энантиоселективность, которая конкурирует с достигаемой при использовании лучших химических методов, оказалась достаточно неожиданной и была детально исследована методами ферментативной кинетики с привлечением большого количества аналогов субстратов и близких по строению ингибиторов, в том числе дейтерированных.^{49, 50} Особый интерес вызывает связь энантиоселективности действия КА с пространственной структурой гаптена, используемого для его генерации, и природа энантиоселективного действия КА, т.е. причина возникновения S- или R-конфигурации нового хирального центра. Предположения авторов⁵⁰ сводятся вкратце к следующему. Конформация гаптена **77** (R¹ = Me, R² = CH₂Ar), которая определяет особенности формируемой полости активного центра КА при биосинтезе его в иммунном аппарате, установлена с помощью ингибиторного анализа. Было показано, что пиперидиновый цикл в молекуле **77** имеет форму кресла с N-бензильной группой в аксиальном положении и N-метильной в экваториальном. Образованию такой конформации способствует наличие заместителя у атома C(3) пиперидинового цикла, также занимающего экваториальное положение. В сформировавшемся активном центре КА молекула субстрата — эфира **75** — будет располагаться, «повторяя» конформацию гаптена, который определил стерические особенности полости активного центра. При этом бензильный остаток субстрата, обеспечивающий «узнавание» субстратом активного центра и фиксацию его в полости активного центра, располагается подобно бензильному остатку гаптена **77**. Благодаря наличию в активном центре анионоидной группы (предположительно карбоксильной) в субстрате возникает положительно заряженный оксониевый центр и возбужденная молекула субстрата принимает конформацию A.

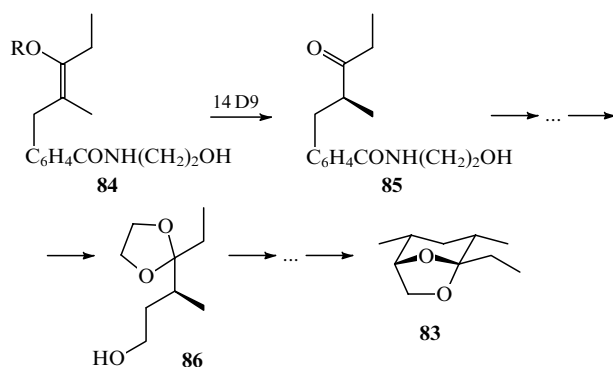


Она располагается в активном центре, как бы повторяя конфигурацию гаптена, делая тем самым доступным для энантиоселективного протонирования β-углеродный атом субстрата с *r,e*-стороны и обеспечивая образование альдегида **82** с S-конфигурацией. Следовательно, энантиоселективность протонирования и образование альдегида с S-конфигурацией предопределены конфигурацией гаптена **77**.

Авторы⁵⁰ подчеркивают, что особенность предлагаемого процесса энантиоселективного формирования нового хирального центра состоит в том, что в данном случае гаптен формирует активный центр КА, который комплементарен не к нейтральной молекуле субстрата, а к возбужденной, готовой к атаке протона. Это и определяет строгую направленность этой атаки в пространстве и высокую энантиоселективность процесса. Таким образом, выбор структуры гаптена, моделирующего возбужденное состояние молекулы субстрата, является, по мнению авторов,^{49, 50} существенным моментом в создании КА с высокой энантиоселективностью.

Подобные КА могут приобрести важное значение для развития асимметрического синтеза — введения первого хирального центра с заданной абсолютной конфигурацией в ахиральную молекулу.⁵¹ Примером является использование КА в синтезе феромона (–)-α-мультистратина (**83**).

¶ Чтобы избежать частичной рацемизации образующегося карбонильного соединения, которая может протекать в условиях реакции и искажать стереохимический результат, превращение енолов, катализируемое КА, проводили в присутствии цианида, который переводит карбонильное соединение в циангидрин и фиксирует его конфигурацию.



Ключевой стадией этого синтеза являлось энантиоселективное введение с помощью КА хирального центра в молекулу субстрата — винилового эфира **84**.⁵² В результате гидролитического расщепления эфира **84** в присутствии каталитического антитела 14D9 с выходом 85% и высокой энантиоселективностью (95% *ee*) получен кетон **85**. Реакция гидролиза в присутствии КА ускорилась в $6.5 \cdot 10^4$ раз. Кетон **85** был затем превращен в кеталь **86** и далее в (–)-α-мультистратин (**83**).

Разработана простая лабораторная методика⁵³ для синтеза веществ в граммовых количествах с использованием КА, предусматривающая удаление продукта реакции диализом. При этом КА, остающееся в диализном мешке, может быть использовано повторно, что позволяет в конечном счете употреблять небольшое количество КА. Создана небольшая лабораторная установка специально для проведения реакции в присутствии КА, работающая в полуавтоматическом режиме.⁵⁴

Использование КА при гидролизе виниловых эфиров позволяет порой изменить ход реакции и осуществить превращение, которое невозможно в обычных условиях. Так, например, удивительный результат был получен при гидролизе винилового эфира **87** в присутствии КА 14D9 (схема 7). В результате гидролиза могут образоваться либо кетон **88**, либо циклический кеталь **89**.⁵²

В водной среде (в отсутствие КА 14D9) кислотно-катализируемая реакция дает исключительно кетон **88**, поскольку гидроксильная группа винилового эфира **87** не может конкурировать с водой, имеющейся в избытке в реакционной среде. Напротив, в органическом растворителе образуется циклический кеталь **89**. Однако при проведении реакции в присутствии КА в водной среде наряду с кетоном **88** образуется 12% циклического кетала **89**. Образование обоих продуктов реакции подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен. Оба продукта имеют *S*-конфигурацию и образуются с очень высокой энантиоселективностью (99.5% *ee*), что свидетельствует об участии активного центра КА в их

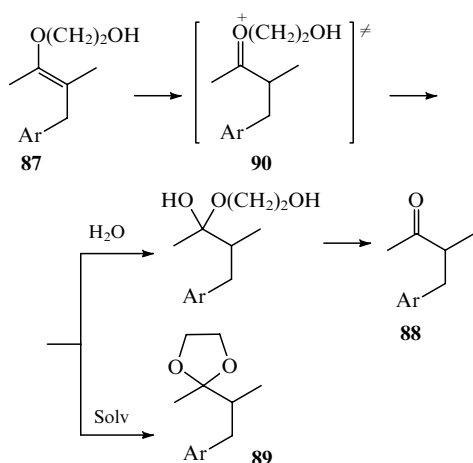
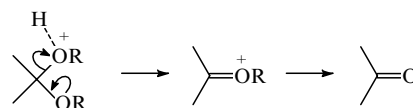


Схема 7

формировании через общее переходное состояние **90**. Таким образом, в водной среде в присутствии КА удается получить продукт реакции — кеталь **89**. Участие воды в этом процессе исключается за счет того, что в полости активного центра создается гидрофобное окружение, в котором и протекает реакция.

Механизм реакции гидролиза ацетальной связи в присутствии кислых реагентов в принципе мало отличается от механизма гидролиза виниловых эфиров. В обоих случаях процесс протекает через стадию протонирования. Однако протонирование ацеталей, в отличие от виниловых эфиров, проходит по атому кислорода ацетальной группировки.



Оказалось, что КА, эффективные при гидролизе виниловых эфиров, обладают каталитическим действием и при гидролизе ацеталей.⁵⁵ Это хорошо видно на примере сравнительного гидролиза винилового эфира **91** и кетала **92** в присутствии одного и того же КА (схема 8).

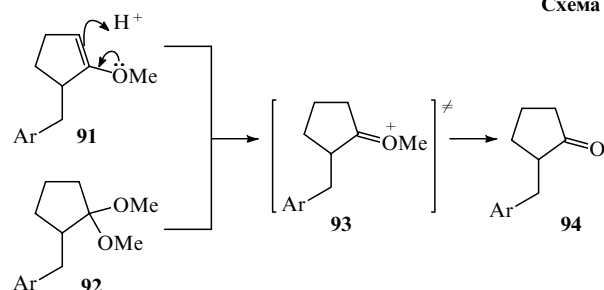
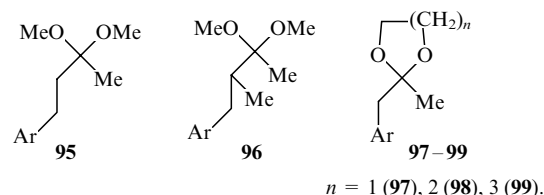


Схема 8

Обе реакции протекают через одно и то же переходное состояние **93** и завершаются образованием кетона **94**. В водной среде при обычном кислотном катализе в отсутствие КА гидролиз ацетала **92** идет значительно быстрее, чем эфира **91** (соотношение скоростей гидролиза **91** и **92** составляет 0.09 : 1). В присутствии КА 14D9 соотношение скоростей драматически меняется на обратное (**91** : **92** = 1100 : 1). Была изучена зависимость реакционной способности ацеталей при гидролизе от их строения. Оказалось, что ациклические кетали **95** и **96**, которые в отсутствие КА гидролизуются медленнее, чем циклический кеталь **92** (соотношение скоростей **95** : **96** : **92** = 0.23 : 0.38 : 1), в присутствии КА показывают противоположную реакционную способность (соотношение скоростей **95** : **96** : **92** = 90 : 8 : 1).



Авторы склонны объяснить эти различия в реакционной способности тем, что стерические напряжения, возникающие в полости активного центра КА в процессе протонирования и дальнейшего распада ацетала, играют большую роль в случае конформационно жесткого циклического кетала **92**, чем в случае его конформационно подвижных ациклических аналогов **95** и **96**.

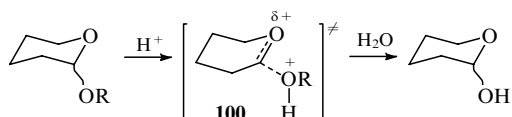
Однако дело, очевидно, не только в этом. Недавно была изучена сравнительная эффективность того же КА (14D9) при гидролизе других циклических кеталей — соединений **97–99** — в зависимости от величины их цикла.⁵⁶ Оказалось, что эффективность КА падает с увеличением размера цикла (соотношение скоростей гидролиза **97** : **98** : **99** равно 1 : 0.37 : 0.04). Эти данные и сравнение констант связывания

этих ацеталей с константами связывания их комплементарных азаалициклических аналогов, в которых ацетальному атому углерода соответствует аммонийный атом азота, дали авторам повод считать, что эффективность КА зависит в первую очередь от электростатической комплементарности его активного центра с субстратом, а конформационная напряженность, возникающая в процессе реакции, имеет меньшее значение.

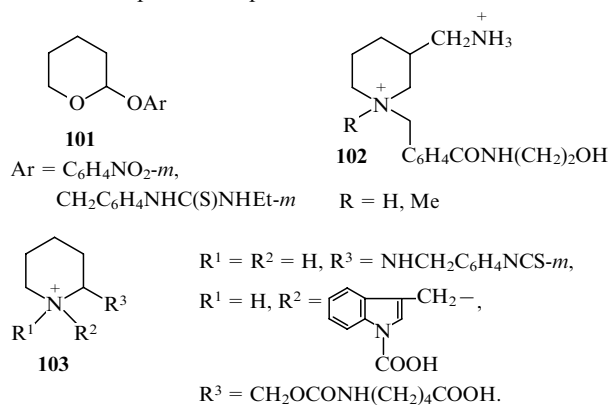
В заключение кратко остановимся на попытках получения КА, катализирующих гидролиз полуацеталей (в частности, разрыв гликозидной связи).

Гидролиз гликозидной связи в условиях кислотного катализа протекает через переходное состояние **100** с оксокарбениевым ионом в шестичленном цикле, имеющем конформацию полукресла (схема 9).

Схема 9



В работах ^{57, 58} была предпринята попытка получить КА, катализирующее гидролиз простейшего модельного соединения — 2-арилоксипирана **101**.



Для этих целей использовали гаптены **102**, аналогичные гаптену **77**, содержащие у атома C(3) группировку CH₂NH₃⁺, а также гаптены **103**, содержащие замещенную аминную группу у атома C(2). В обоих случаях были получены КА, умеренно ускоряющие реакцию гидролиза модельного субстрата **101**, но неэффективные при гидролизе более сложных соединений.

Эти данные указывают на принципиальную возможность получения КА, катализирующих расщепление гликозидной связи. Однако для получения достаточно активных и селективно действующих искусственных гликозидаз необходимо решить вопросы, касающиеся подбора гаптена, моделирующего полукреслообразное переходное состояние и несущего положительный заряд, и моделирования полизамещенной полихиральной молекулы реального моносахарида.

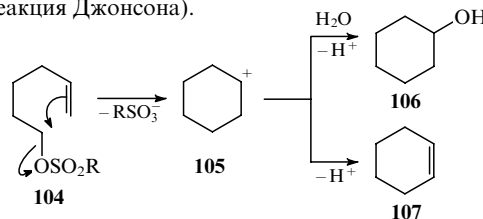
VI. Образование углерод-углеродных связей

Вероятно, наибольший интерес для препаративного органического синтеза представляет получение КА, способных катализировать реакции, приводящие к образованию новых углерод-углеродных связей, формирующих скелет органической молекулы. К ним относятся КА, повышающие эффективность уже известных реакций и улучшающие их регио- и стереоспецифичность, а также КА, позволяющие изменить направление некоторых реакций по сравнению с их направлением в некатализируемом режиме. В конечном счете, это может привести к открытию новых реакций, которые нельзя осуществить традиционным химическим путем (так называемые «неблагоприятные превращения»).

Из большого количества реакций, сопровождающихся образованием С—С-связи, известно лишь несколько, для которых удалось получить КА. К настоящему времени получены КА, катализирующие реакции катионной циклизации, реакции, идущие по механизму сигматропных перегруппировок, и перициклические реакции, а также одну из наиболее общих реакций образования углерод-углеродных связей — альдольную конденсацию.

1. Катионная циклизация

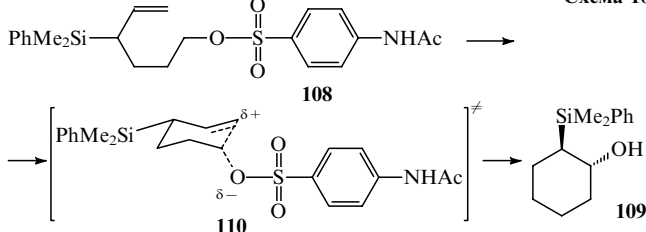
Катионная циклизация широко используется в синтезе карбоциклических систем. Давно известна циклизация арилсульфонатов неперелых спиртов, происходящая при их сольволизе и приводящая к производным циклогексана (реакция Джонсона).



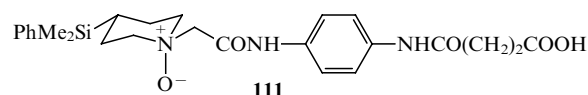
Реакция протекает как внутримолекулярная электрофильная атака по двойной связи сульфоната **104** карбокатионом, образующимся при сольволизе С—О-связи. Возникающий при этом циклический карбокатион **105** может далее стабилизироваться либо за счет присоединения внешнего нуклеофила с образованием, например, спирта **106**, либо за счет элиминирования протона с образованием олефина **107**. В обычных условиях реакция чаще всего сопровождается образованием сложной смеси соединений, что сильно препятствует ее использованию. Поэтому поиск КА, способных не только ускорить реакцию, но, главное, повысить ее специфичность, представляет существенный интерес.

В работе ⁵⁹ изучена реакция циклизации сульфоната **108** в производное циклогексанола **109** (схема 10). Предполагается, что реакция протекает через образование переходного состояния **110**, в котором исходный субстрат принимает креслообразную конформацию, а связь С—О сульфоната поляризуется, при этом на атоме углерода появляется избыточный положительный заряд. Таким образом, активный центр КА должен способствовать образованию и стабилизации карбокатиона и формированию креслообразной конформации субстрата, облегчая этим стерические условия циклизации.

Схема 10



В качестве гаптена, способствующего формированию активного центра КА, пространственно и электронно комплементарного переходному состоянию, было избрано производное *N*-оксида пиперидина **111**, содержащее необходимый для иммобилизации спейсер, включающий остаток янтарной кислоты.

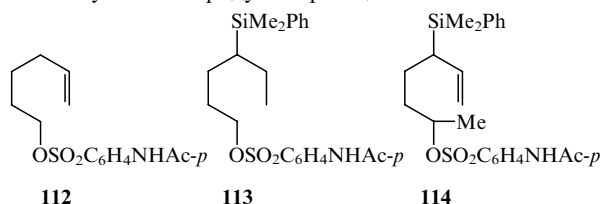


В соединении **111** наряду с пространственно близким переходному состоянию шестичленным циклом присут-

стствует фрагмент N→O, который стерически и электронно моделирует образование и разрыв связей при трансформации сульфоната **108** в производное циклогексана. Фенилдиметилсилильная группа введена в субстрат **108** и, соответственно, в гаптен **111** для удобства аналитического контроля за ходом циклизации. Авторы полагают также, что силильная группа, занимающая квазиэкваториальное положение, способствует закреплению креслообразной конформации цикла субстрата в переходном состоянии, а за счет β-эффекта атома кремния стабилизирует образование циклического карбокатиона — первичного продукта циклизации.

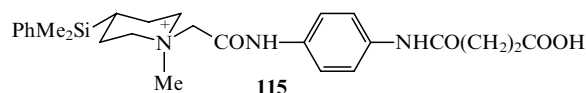
С использованием гаптена **111** была получена группа антител, из которых выделено несколько КА, катализирующих сольволиз сульфоната **108**. Одно из них (4C6), катализирующее циклизацию субстрата **108** с образованием спирта **109**, было исследовано детально.⁵⁹ Оказалось, что сольволиз сульфоната **108** в двухфазной системе при pH 7 в присутствии КА протекает с соблюдением кинетики Михаэлиса–Ментен и по сравнению с некатализируемой реакцией ускоряется в несколько тысяч раз. Но что самое главное, в присутствии КА реакция происходит строго стереоспецифично. В реакционной смеси присутствует 98% циклогексанола **109**, имеющего *транс*-конфигурацию, и лишь 2% продукта элиминирования — производного циклогексена; другие побочные продукты отсутствуют. Следует отметить, что в отсутствие КА сольволиз сульфоната **108** приводит к сложной смеси продуктов, в которой содержится менее 30% спирта **109**.

Отметим, что каталитическое антитело 4C6 отличается высокой субстратной специфичностью. Превращение аналогов сульфоната **108** — соединений **112** и **113** — не катализируется этим КА вовсе, а сульфонат **114**, имеющий дополнительную метильную группу и образующий при сольволизе вместо первичного вторичный карбокатион, дает сложную смесь продуктов реакции.⁵⁹



Эти данные позволили авторам сделать заключение, что реакция циклизации в присутствии КА идет по согласованному механизму: двойная связь в сульфонате **108** анхимерно ускоряет образование карбокатиона, а образующийся циклический катион (типа **105**) немедленно подвергается воздействию внешнего нуклеофила. Таким образом, каталитическое антитело 4C6 не только инициирует реакцию путем генерации карбокатиона, но и благодаря комплементарности активного центра КА субстрату способствует его дальнейшим превращениям, а именно циклизации. В пользу этой точки зрения свидетельствует и тот факт, что из всех КА, генерированных к гаптену **111**, только 4C6 вызывает циклизацию, остальные же просто ускоряют сольволиз сульфоната **108** (т.е. способствуют образованию карбокатиона) без последующей циклизации (см. ниже).

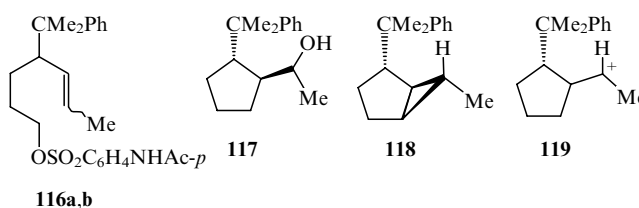
Характер и соотношение продуктов циклизации непредельных сульфонатов типа **108** зависит также от природы КА, т.е. от строения инициирующего его гаптена. Так, оказалось, что соотношение продуктов циклизации сульфоната **108** может быть полностью обращено, если вместо КА 4C6 использовать КА 87D7, генерированное к гаптену **115** — очень близкому аналогу гаптена **111**.



Соединение **115** содержит вместо группировки N→O группу N⁺—Me.⁶⁰ Циклизация сульфоната **108** в присутствии этого КА дает 90% производного циклогексена и лишь 10% циклогексанола **109**. Было показано, что субстрат **108** принимает в активных центрах обоих КА (4C6 и 87D7) фактически одинаковую конформацию. Поэтому различие в соотношении продуктов циклизации следует отнести не за счет конформационного эффекта, а за счет различия в зарядах на атоме азота цикла: аммонийная группа наводит в активном центре КА больший отрицательный заряд, чем атом азота N—O-группы.

Если субстрат **108** заменить его аналогом **116a**, содержащим вместо силильной группировки группировку CMe₂Ph, то направление циклизации под действием КА 87D7 изменится. В этом случае циклизация дает соответствующий циклогексанол с выходом 60%.

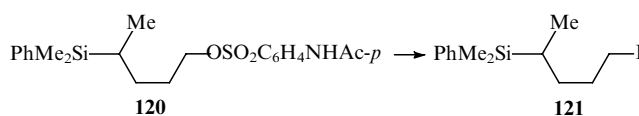
Еще значительнее меняется направление циклизации сульфоната **116b**, содержащего пропенильную группу вместо винильной.⁶¹



R = H (**116a**), Me (**116b**).

В присутствии КА 87D7 сольволиз *цис*-изомера **116** приводит с выходом 80% к спирту **117**, а сольволиз *транс*-изомера дает в качестве главного продукта производное бицикло[3.1.0]гексана **118**. Этот неожиданный результат можно объяснить тем, что в отсутствие силильной группы β-эффект, ответственный за стабилизацию шестичленного карбокатиона, не проявляется. В результате возникает карбокатион **119**, который стабилизируется либо благодаря атаке внешнего нуклеофила (при этом образуется спирт **117**), либо благодаря выбросу протона с образованием бициклического соединения **118**.

Как указывалось ранее, среди антител, генерированных к гаптену **111**, найдены КА, способствующие сольволизу и образованию карбокатиона, но не катализирующие процесс циклизации. Одно из них — КА 16B5 — послужило удобным инструментом для выяснения механизма образования карбокатиона при сольволизе арилсульфонатов под действием КА.⁶² С этой целью было изучено превращение сульфоната **120** в иодид **121** в условиях сольволиза.



Оказалось, что КА 16B5 является хорошим катализатором реакции, ускоряя ее более чем в 500 раз. При изучении кинетики реакции и при проведении ее в присутствии других нуклеофилов (NaSCN, NH₃) найдено, что КА 16B5 способствует образованию карбокатионного центра в переходном состоянии. Этот вывод был подтвержден также измерением вторичного изотопного эффекта, наблюдаемого для α- и β-дейтерированных аналогов сульфоната **120**. Исследование катализируемого КА сольволиза дейтерированных аналогов показало, что замещение сульфонилкислородной группы на атом иода идет с обращением конфигурации. Это можно объяснить тем, что карбокатион образуется в виде тесной ионной пары, находящейся в равновесии с ковалентным сульфонатом.

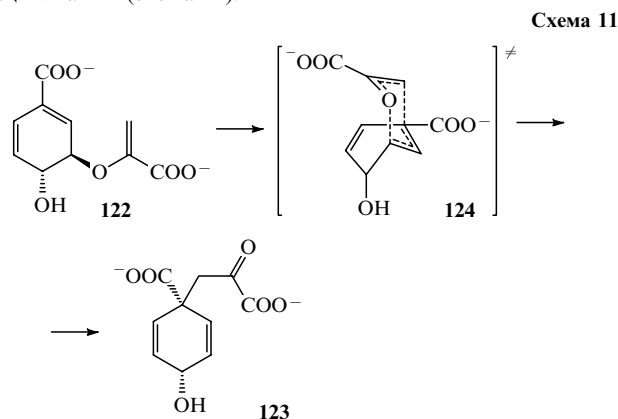
В заключение следует отметить, что направление реакции определяется особенностями как активного центра КА, так и деталями строения субстрата. Эти особенности сказываются на всех стадиях процесса: на генерации карбокатиона, его

стабилизации и величине «положительного заряда», на возможных путях трансформации карбокатиона и на стабилизации вторичного карбокатиона.

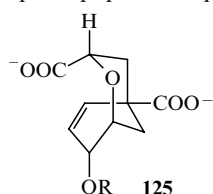
Рассмотренные выше примеры карбокатионной циклизации[†] свидетельствуют о широких возможностях использования КА для целенаправленного синтеза тех или иных циклических продуктов путем тонкого варьирования природы КА (за счет изменения гаптена) и структуры субстрата.

2. Кляйзеновская перегруппировка эфиров енолов

Перегруппировка эфиров енолов по Кляйзену, состоящая в разрыве О—С-связи и переносе енольного остатка с образованием новой углерод-углеродной связи, широко применяется для синтеза сложных органических структур, в особенности природных соединений. Возможность получения КА, катализирующих эту реакцию, была изучена^{64–66} на примере перегруппировки хоризмовой кислоты (**122**) в префеновую кислоту (**123**). Эта перегруппировка является одной из ключевых стадий в биосинтезе ароматических аминокислот в бактериальной или растительной клетке, где эта реакция катализируется природным ферментом — хоризмат-мутазой. Получение КА, катализирующего эту реакцию, явилось первым примером получения искусственного фермента, катализирующего образование С—С-связи в процессе перicyклической реакции. Перегруппировка кислоты **122** в кислоту **123** протекает как [3.3]-сигматропный согласованный процесс через переходное состояние **124**, которое подобно пространственному строению оксабицикло[3.3.1]нонена, в котором одно шестичленное кольцо имеет конформацию ванны (схема 11).



В переходном состоянии **124** связи, соответствующие структуре субстрата **122**, ослаблены, а связи будущего продукта перегруппировки только наметились. Для получения КА, активный центр которого должен промотировать образование переходного состояния с такой пространственной структурой, был использован гаптен — производное оксабициклононена **125**, содержащее спейсер (R) с активной сукцинимидной группой для иммобилизации на белке. Интересно, что дикарбоновая кислота **125** (R = H) является ингибитором природного фермента — хоризмат-мутазы.



[†] Недавно появилось сообщение о попытке получить КА, катализирующее карбанионную циклизацию — один из вариантов реакции Дикмана.⁶³ Хотя каталитический эффект и наблюдался, но сведения о получении КА и его характеристика отсутствовали.

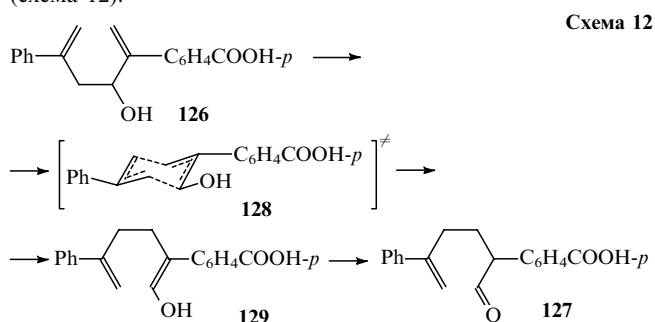
Полученное КА ускорило превращение хоризмовой кислоты (**122**) в префеновую кислоту (**123**) по сравнению с некатализируемой перегруппировкой в $2 \cdot 10^2$ – 10^4 раз (данные двух различных лабораторий). Реакция проходила при 10°C и pH 7 с высокой региоспецифичностью, приводя только к префеновой кислоте. (В отсутствие КА образуется ~5% гидроксибензойной кислоты.) Стереоспецифичность реакции также очень высока. Опыты, проведенные с (+)- и (–)-изомерами хоризмовой кислоты, показали, что только (–)-изомер является субстратом реакции. При использовании рацемата лишь 50% субстрата вступает в реакцию. Измерение кинетики позволило оценить энантиоселективность реакции в присутствии КА как 90 : 1.

Данные рентгеноструктурного анализа комплекса гаптена **125** с генерированным КА⁶⁷ подтвердили комплементарность пространственной структуры активного центра КА структуре гаптена, а следовательно, и структуре переходного состояния **124**. Те факты, что на перегруппировку в присутствии КА не оказывает влияние pH среды и что в активном центре не обнаружены ионные группировки, подтверждают, что перегруппировка в присутствии КА протекает действительно как перicyклический процесс. В работе⁶⁸ оценена роль аминокислотных остатков активного центра в процессе реакции и предложена модель каталитического участия КА в процессе. И хотя изученное КА для реакции кляйзеновской перегруппировки по эффективности заметно уступает природному ферменту, его получение и детальное исследование, как первого КА, катализирующего перicyклический процесс, было существенным достижением в получении искусственных ферментов.

3. Перегруппировка Коупа

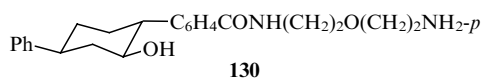
Перегруппировка Коупа также относится к перicyклическим реакциям и протекает как [3.3]-сигматропная перегруппировка. Для нее еще не найден природный фермент.

Возможность получения КА, катализирующих эту реакцию, была изучена на примере превращения производного дифенилгексадиенола **126** в непредельный альдегид **127** (схема 12).⁶⁹



Авторы считают, что перегруппировка протекает через переходное состояние **128**, в котором центральный шестичленный цикл имеет креслообразную конформацию. Первоначально образуется енол **129**, который затем превращается в альдегид **127**, фиксируемый в виде оксима.

Исходя из принятого механизма реакции, в качестве гаптена было выбрано производное дифенилциклогексанола **130**, снабженное спейсерной группировкой. Такой гаптен должен был сформировать активный центр КА, способствующий фиксации в нем субстрата в конформации, оптимально близкой к переходному состоянию, и действующий как «энтропийная ловушка» (см. гл. II). Отсутствие природного фермента, катализирующего перегруппировку Коупа, делало получение каталитических антител особенно интересным, так как позволяло понять общие принципы дизайна гаптенных КА, катализирующих перicyклические реакции.



Наиболее активное из генерированных к гаптenu **130** каталитических антител (AZ-28) ускоряло перегруппировку в 5300 раз. Из двух энантиомеров исходного спирта **130** лишь *S*-изомер вступал в реакцию. Перегруппировку же *R*-изомера указанное КА не катализировало. Исследование кинетики и ингибиторный анализ всех КА, катализирующих эту реакцию, подтвердили, что они действительно формируют в процессе реакции переходное состояние **128**.

Из каталитического антитела AZ-28 был выделен Fab-фрагмент, который удалось наработать в достаточном количестве методом генной инженерии.⁷⁰ Этот важный эксперимент показывает возможность использования каталитических антител, полученных в небольших количествах в лабораторных условиях, для их дальнейшей наработки в значительных количествах с использованием методов современной биотехнологии.

В настоящее время предпринята попытка установить методами молекулярной генетики и рентгеноструктурного анализа механизм каталитического действия КА AZ-28 и его пространственную структуру.

4. Реакция Дильса – Альдера

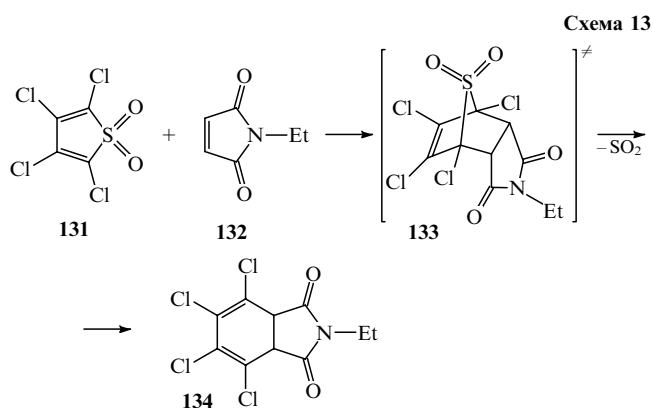
Реакция Дильса – Альдера лежит в основе одного из важнейших синтетических методов получения шестичленных алициклических систем путем конденсации диена с олефином (диенофилом). Она относится к реакциям $4\pi + 2\pi$ -циклоприсоединения. Разрыв одних связей в компонентах реакции и образование других проходит как единый согласованный процесс в соответствии с закономерностями перicyклической реакции. Успех конденсации зависит от взаимного расположения диена и диенофила, которые должны находиться в переходном состоянии в подходящей конформации, обеспечивающей возможность протекания перicyклического процесса.

Для осуществления реакции Дильса – Альдера до сих пор не найдено природного фермента, поэтому получение эффективного КА представляло принципиальный интерес. Диеновая конденсация часто проходит как самопроизвольный экзотермический процесс, поэтому основным назначением КА было не повышение скорости реакции, а изменение ее регио- и стереоселективности.

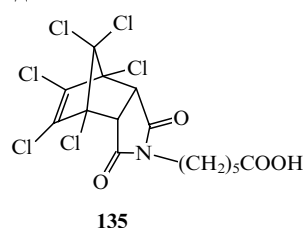
Каталитическое действие активного центра КА сводится к ограничению подвижности диена и диенофила и к их фиксации в нужной конформации. Таким образом, активный центр КА в первую очередь должен играть роль «энтропийной ловушки» (см. гл. II), а наличие в нем активных группировок имеет меньшее значение. При дизайне гаптена, предназначенного для генерации КА, важно иметь в виду, что полученное КА не должно ингибироваться конечным продуктом реакции. Это может привести к уменьшению «числа оборотов фермента» и, следовательно, к снижению его эффективности. Поэтому пространственная структура активного центра КА должна быть близка к пространственной структуре переходного состояния и по возможности отличаться от строения конечного продукта реакции.

В настоящее время получено несколько КА, катализирующих реакцию Дильса – Альдера. Первые КА были генерированы для ускорения конденсации тетрахлортиофендиоксида (**131**) с *N*-этилмалеимидом (**132**), протекающей через промежуточное образование трициклического сульфона **133**, который, спонтанно элиминируя SO_2 , дает производное дигидрофталимида **134** (схема 13).⁷¹

В качестве гаптена было выбрано трициклическое производное **135**, аналогичное по строению промежуточному продукту **133**, содержащее остаток гексановой кислоты,

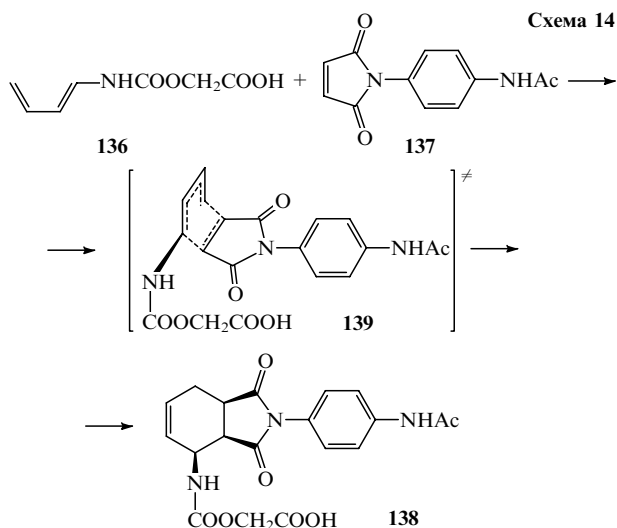


необходимый для иммобилизации. В то же время строение гаптена **135** отличается от строения конечного продукта — имида **134**.

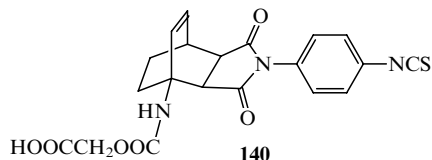


Существовала опасность, что активная сульфонильная группировка, имеющаяся в молекуле **131**, будет реагировать с аминогруппами лизина, содержащимися в КА, и тем необратимо нарушать его функцию. Поэтому в полученном КА аминогруппы лизина метилировались действием CH_3O с последующим восстановлением NaBH_3CN . Такое метилированное КА оказалось вполне активным и многократно ускоряло диеновую конденсацию сульфона **131** с имидом **132**. Его действие отличалось субстратной специфичностью. При замене *N*-этилмалеимида на малеимид КА не проявляло каталитического действия.

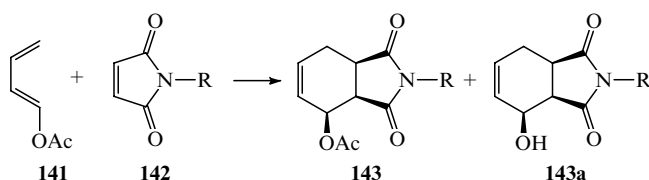
Интересным примером служит получение КА, катализирующего конденсацию ациклического диена **136** с производным малеимида **137**. В результате реакции образуется производное *cis*-тетрагидрофталимида **138**.⁷² Реакция протекает через переходное состояние **139**, в котором диен принимает цисоидную конформацию, а его комплекс с диенофилом **137** имеет конформацию ванны. Это способствует прохождению перicyклического процесса и обеспечивает *cis*-сочленение колец в продукте реакции **138** (схема 14).



Для генерации активного центра КА, моделирующего это переходное состояние, был выбран гаптен **140**, содержащий циклогексановое кольцо, закрепленное в конформации ванны этиленовым мостиком, и изотиоцианатную группировку, необходимую для иммобилизации гаптена. Наиболее активное из полученных КА ускорило реакцию конденсации диена **136** с имидом **137** примерно в 500 раз и следовало кинетике Михаэлиса – Ментен. Показано, что продукт реакции **138** связывается с КА примерно в 100 раз слабее, чем исходные соединения **136** и **137**. Таким образом, КА практически не ингибируется продуктом реакции.

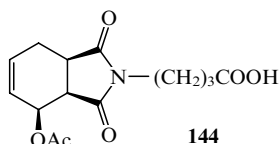


Имеются данные^{73, 74} о получении КА, катализирующего сходную реакцию — конденсацию 1-ацетоксибутадиена (**141**) с *N*-метил- и *N*-бензилмалеимидами **142**, приводящую к *N*-замещенным тетрагидрофталимидам **143**.



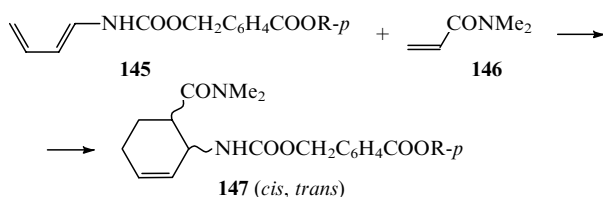
R = Me, Bn.

По данным авторов,^{73, 74} полученное к гаптену **144** каталитическое антитело ускорило конденсацию диена **141** с диенофилом **142** более чем в 1000 раз. Оно отличалось субстратной специфичностью и не проявляло активности при замене диена **141** на более активный метоксибутадиен или пиперилен.



Оказалось также, что активность этого КА зависит от pH, чего не наблюдалось для других КА, катализировавших диеновую конденсацию. Авторы объясняют это тем, что данное КА обладает также эстеразной активностью, т.е. представляет собой уникальный пример КА с двойной активностью. Это объяснение, однако, кажется недостаточно убедительным, хотя побочный продукт реакции — спирт **143a** — действительно был выделен.

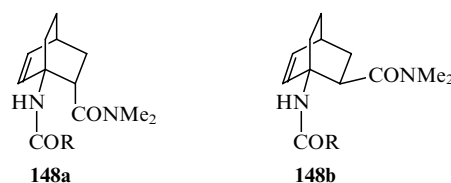
Ключевым моментом при использовании реакции Дильса – Альдера является вопрос о ее стереоспецифичности. Этот вопрос был специально исследован на примере конденсации двух ациклических компонентов — *транс*-1-*N*-(алкоксикарбонил)аминобутадиена **145** и *N,N*-диметил-акриламида **146**, приводящей к производному циклогексена **147**.⁷⁵



Эта реакция может привести к четырем соединениям — двум 1,2-изомерам с *цис*(*эндо*)- и *транс*(*экзо*)-конфигурацией и двум 1,3-изомерам с *цис*(*эндо*)- и *транс*(*экзо*)-конфигурацией. При конденсации соединений **145** и **146** в отсутствие

КА образуются только 1,2-изомеры в соотношении *цис*:*транс* = 66:34 (термическая конденсация) или 85:15 (конденсация в фосфатном буфере). Таким образом, реакция лишена стереоспецифичности. Анализ молекулярных моделей и расчет переходных состояний, ведущих к образованию каждого изомера,[‡] показал, что энергия переходного состояния для 1,2-изомеров на 2–4 ккал·моль^{–1} ниже, чем для 1,3-изомеров. Причем для 1,2-изомера с *цис*-конфигурацией энергетический барьер ниже, чем для *транс*-изомера, т.е. образование *транс*-изомера («неблагоприятная» реакция) энергетически менее выгодно.

Удалось получить КА, избирательно направляющие конденсацию соединений **145** и **146** в сторону образования как *цис*-, так и *транс*-изомеров. Для имитации переходных состояний были использованы гаптены **148a** и **148b** с жестко закрепленным этановым мостиком, в которых группировки CONMe₂ и NHCOR, соответствующие группировкам компонентов реакции («группировки узнавания»), располагаются в *цис*- или *транс*-положении по отношению друг к другу.



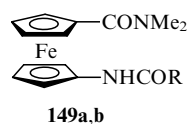
R = (CH₂)₃COONC(O)CH₂CH₂C(O).

К этим гаптенам были получены две группы КА, из которых выбраны по одному представителю, катализирующему конденсацию соединений **145** и **146** в водной среде при pH 7 с образованием соответственно *цис*- (КА 7D4, *эндо*-«Дильс – Альдераза») и *транс*-изомеров (КА 22C8, *экзо*-«Дильс – Альдераза»). Их эффективность не слишком высока — они ускоряют реакцию в 960 (в случае КА 22C8) и 740 (КА 7D4) раз по сравнению с некатализируемой реакцией. Интересно, что *экзо*-КА ускоряло «неблагоприятную» реакцию образования *транс*-изомера сильнее, чем *эндо*-КА. Оба КА обеспечивали практически полную стереоселективность реакции: в присутствии КА 7D4 получался *цис*-изомер **147**, а в присутствии КА 22C8 — *транс*-изомер **147** со стереоселективностью, превышающей 98%. Таким образом, удалось получить искусственные ферменты (*эндо*- и *экзо*-«Дильс – Альдеразы»), обладающие высокой стереоспецифичностью.

Очень интересный и принципиально иной подход к получению стереоспецифических КА для реакции диеновой конденсации был продемонстрирован в недавно опубликованной работе⁷⁶. В отличие от описанного выше традиционного подхода, основанного на использовании конформационно жестких гаптенных, в данной работе авторы предлагают использовать конформационно подвижные гаптены. Они исходят из противоположной идеи: иммунный аппарат может вырабатывать антитела к отдельным конформерам конформационно подвижного гаптена и в том числе к конформерам, «замороженная» конформация которых будет соответствовать переходным состояниям, возникающим при образовании определенных стереоизомеров. Таким образом, в результате биосинтеза возникает набор антител, из которых могут быть отобраны КА с нужной специфичностью.

Эта идея была проверена на примере конденсации соединений **145** и **146**. Для имитации переходного состояния реакции были применены гаптены **149a,b**, производные ферроцена, содержащие «группировки узнавания» субстрата, одна из которых служила спейсером (это первый случай использования металлоорганических соединений для подобной цели).

[‡] Расчет проводился с использованием упрощенной модели диеновой компоненты реакции.



149a: R = (CH₂)₃COOH;
149b: R = C₆H₄COOH-*p*.

При этом учитывалось, что π -делокализованная система и два плоских цикlopентадиенильных кольца ферроцена, находящиеся на расстоянии 3.3 Å и достаточно свободно вращающиеся вокруг общей оси, способны создать в активном центре КА полость, которая по своим размерам и пространственной конфигурации, будет способствовать сближению и нужному взаиморасположению диена и диенофила. Вращение пятичленных колец обеспечивает возникновение необходимых стерических комбинаций в гаптене, имитирующих различные переходные состояния, формирующиеся при образовании различных стереоизомеров продукта реакции.

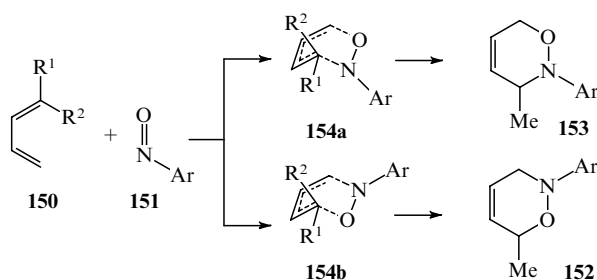
Из большой группы генерированных к соединениям 149a и 149b антител были отобраны два наиболее активных и стереоспецифических по своему действию КА — *эндо*-КА (4D5) и *экзо*-КА (13G5). Их исследование показало, что они незначительно ускоряют реакцию конденсации и уступают в этом отношении КА, генерированным к «жестким гаптенам». Однако их специфичность очень высока: конденсация субстратов 145 и 146 в присутствии этих КА приводит к образованию только 1,2-изомеров: *эндо*-КА (4D5) дает *цис*-изомер 147, а *экзо*-КА (13G5) — *транс*-изомер 147 с высокой диастереоселективностью (98% *ee*) и энантиоселективностью (95% *ee*). Таким образом, концепция о возможности использования для получения стереоспецифических КА конформационно подвижных гаптен, которые по геометрическим и электронным параметрам соответствуют переходному состоянию реакции диеновой конденсации, полностью оправдалась.

Сравнительная характеристика КА, полученных к «жестким» (например, к бицикло[2.2.2]октанам 148) и конформационно подвижным гаптенам 149, приводит к выводу, что «антиферроценовые» КА имеют более объемистую полость активного центра (так как молекула ферроцена больше молекулы бицикло[2.2.2]октана) и поэтому они реагируют с «жесткими» гаптенами, в то время как КА к «жестким» гаптенам не реагирует с конформационно подвижными гаптенами.

Хотя практической ценности «антиферроценовые» КА пока не представляют, тем не менее полученный результат очень существен — он намечает принципиально новый подход к получению КА со стереоспецифическим действием посредством отбора их из группы антител, генерированных к конформационно подвижному гаптену.

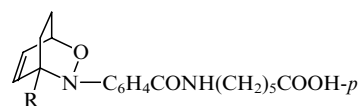
Наряду с КА, катализирующими классическую реакцию Дильса–Альдера, получено первое КА, катализирующее гетеродиеновую конденсацию *цис*-пиперилена 150 с производным 4-нитрозобензамида 151, приводящую к изомерным дигидро-1,2-оксазинам 152 и 153 (схема 15).⁷⁷

Схема 15



R¹ = H, R² = Me; Ar = C₆H₄CONHPr.

Данное КА было генерировано к «жесткому» гаптену 155, который имитирует предполагаемое переходное состояние реакции 154, имеющее конформацию ванны.



Каталитическое антитело ускоряет конденсацию *цис*-пиперилена 150 (R¹ = H, R² = Me) в 2600 раз; однако его эффективность в конденсации *транс*-пиперилена (R¹ = Me, R² = H) много ниже.⁷⁸ Региоспецифичность реакции в присутствии этого КА также возрастает: некатализируемая реакция диена 150 с избытком нитрозосоединения 151 приводит к оксазинам 152 и 153 в соотношении 48 : 52, в то время как при проведении реакции в присутствии 10% КА это соотношение меняется до 32 : 68, а в присутствии эквимольного количества КА образуется 95% изомера 153 с высокой энантиоселективностью (82% *ee*). По-видимому, это происходит за счет подавления вяло протекающей параллельной некатализируемой реакции. Действие КА полностью ингибируется аналогом гаптана 155, в котором группа (CH₂)₅COOH заменена на *n*-пропильную. Это доказывает, что катализируемая реакция проходит в полости активного центра КА.

5. Альдольная конденсация

Альдольная конденсация — одна из наиболее изученных реакций, происходящая в условиях кислотно-основного катализа, приводящая к возникновению новой C—C-связи и к образованию β -гидроксикарбонильной (альдольной) системы. Она занимает видное место среди процессов, происходящих в живой клетке. Несмотря на многочисленные модификации и варианты этой реакции, позволяющие осуществлять ее эффективно и с высокой регио- и стереоселективностью чисто химическим путем, интерес к поиску специфических КА, позволяющих повысить селективность этой реакции, не ослабевает. Известно большое число природных ферментов (альдозаз), катализирующих эту реакцию, но обычно они обладают довольно узкой специфичностью, что затрудняет их использование. Получение КА с более широкой и/или «заказанной» специфичностью было бы весьма полезным для органического синтеза.

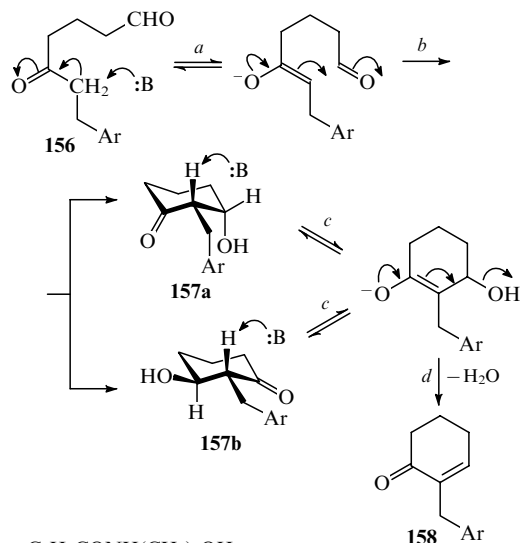
Для получения КА, катализирующих альдольную конденсацию, используется несколько подходов. Один из них исходит из общеизвестных химических представлений о механизме образования β -гидроксикарбонильной системы при конденсации двух молекул карбонильных соединений в условиях кислотно-основного катализа. Другие в той или иной мере воспроизводят каталитический процесс, происходящий под действием природных ферментов — альдозаз.

Примером использования первого пути может служить получение КА, катализирующего внутримолекулярную циклизацию кетоальдегида 156. Реакция проходит через образование двух стереоизомерных циклических альделей 157a и 157b, находящихся в равновесии, и элиминирование молекулы воды приводит в конечном счете к производному циклогексенона 158 (схема 16).⁷⁹

Получение КА, катализирующего данную реакцию, представляется более сложной задачей, чем получение КА, описанное ранее в этом обзоре, так как в данном случае речь идет о многостадийном процессе. Чтобы привести к ускорению суммарного процесса циклизации кетоальдегида 156 в енон 158, катализатор должен стабилизировать несколько переходных состояний, понижая энергетический барьер на общей координате реакции.

Задача была удачно решена благодаря тому, что в данном случае все стадии процесса проходили в условиях кислотно-основного катализа, причем промежуточные соединения (и соответствующие переходные состояния) по своему пространственно-электронному строению были близки. Это

Схема 16



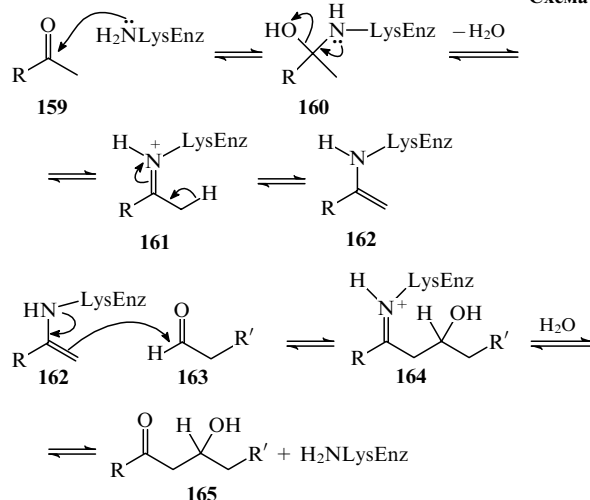
позволило использовать для генерации КА единый гаптен **77**, сформировавший активный центр КА, который обеспечивал каталитический эффект на всех стадиях процесса. Гаптен **77** структурно сходен с циклическими альдолями **157a** и **157b** и с конечным продуктом реакции **158**. Положительный заряд на атоме азота в гаптене **77** генерирует в комплементарной позиции активного центра КА появление карбоксильной группы, которая обеспечивает кислотно-основной катализ на стадиях енолизации (схема 16, стадия *a*) и элиминирования (стадии *c* и *d*).

Среди антител, полученных к гаптenu **77**, два оказались каталитически активными в реакции циклизации кетоальдегида **156**, причем реакция следовала кинетике Михаэлиса–Ментен и ингибировалась одним из аналогов гаптена, что свидетельствовало о ее прохождении в активном центре КА. Одно из КА (78Н6) исследовалось детально. Установлено, что имеет место общий основной катализ, причем КА 78Н6 является очень мощным катализатором этого процесса. Любопытно, что стадии дегидратации (стадии *c* и *d*) протекают как энергетически менее выгодные («неблагоприятные») реакции *транс*-элиминирования в промежуточном альдоле **157a** с соблюдением регио- и стереоспецифичности. Кинетическими измерениями было показано, что в присутствии КА процесс ускоряется на стадии альдолизации (стадии *a* и *b*) более чем в 10⁵ раз, а на стадии элиминирования (стадии *c* и *d*) — более чем 10⁴ раза, по сравнению с реакцией, проходящей в обычном химическом режиме (в присутствии ацетата). Приведенный пример указывает на принципиальную возможность получения единого КА, катализирующего внутримолекулярный многостадийный процесс, в тех случаях, когда механизм катализа и промежуточные продукты (и, следовательно, переходные состояния), образующиеся на всех стадиях, достаточно близки.

Более интересным и общим по своему значению оказался другой подход — получение КА, работающего по принципу действия природных альдоз. Современное представление о механизме их каталитического действия показано на схеме 17.

ε-Аминогруппа остатка лизина в молекуле фермента, взаимодействуя с карбонильной группой альдоля-донора **159**, образует полуаминаль **160**, который через иммониевый ион **161** превращается в енамин **162**. Последний и является истинным альдоля-донором (нуклеофилом) и ключевым интермедиатом всего процесса. В результате атаки енамином **162** альдоля-акцептора **163** возникает новая связь С—С и образуется иммониевый ион **164**. Его последующий гидролиз дает альдол **165** и регенерирует аминогруппу лизина в альдозе. Все реакции в этой цепочке превращений обратимы,

Схема 17

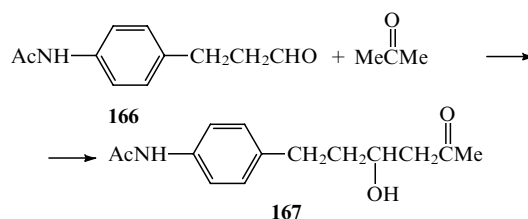


поэтому альдоза катализирует и обратный процесс — ретроальдольный распад.

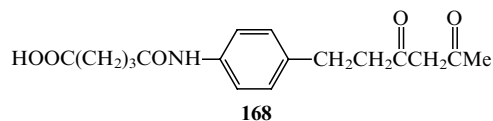
Для того чтобы катализировать всю эту сложную последовательность обратимых реакций, активный центр КА должен снижать энергетические барьеры всех стадий процесса. Трудно представить генерацию такого КА традиционным путем, когда используемый стабильный неакционноспособный гаптен не реагирует с генерированным им антителом, а просто имитирует переходное состояние.

Был предложен принципиально новый подход, получивший название «реактивной иммунизации». В данном случае, наоборот, используемый гаптен вступает во взаимодействие с генерированным антителом с образованием ковалентной связи. Формирующийся при этом активный центр КА приобретает свойство как бы «воспринимать» эти превращения и способствовать их протеканию. Таким образом, такой гаптен не только способствует формированию в КА переходного состояния, но и, по сути дела, имитирует саму реакцию. При этом в активном центре возникают структурные элементы, облегчающие протекание всей последовательности превращений в этом многостадийном процессе.

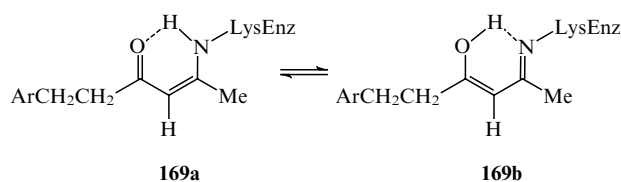
Модельной реакцией, на которой изучалась возможность получения КА альдозного типа,^{80, 81} послужила конденсация 3-(4-ацетидафенил)пропионового альдегида (**166**) с ацетоном, приводящая к 4-гидрокси-6-(4-ацетидафенил)гексанону-2 (**167**).



В качестве гаптена было выбрано производное β-дикетона **168**, структурно сходное с соединениями **166** и **167** и содержащее «группировки узнавания» субстрата и спейсер CO(CH₂)₃COOH.



Гаптен **168** вызывал образование в активном центре КА структурных элементов, способствующих появлению в КА остатка лизина и взаимодействию NH₂-группы этого лизина с субстратом, в результате которого формировался ключевой интермедиат **169** с енаминной структурой.



Ar = C₆H₄NHCO(CH₂)₃COOH-*p*

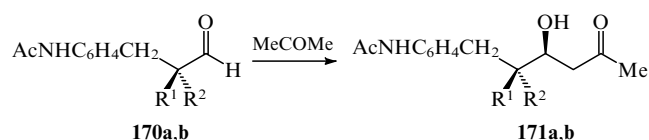
Стабилизация интермедиата **169** осуществлялась за счет равновесия **169a** $\rightleftharpoons$ **169b** и появления сопряженной системы — винилога карбоксимида.

Кроме того, гаптен способствовал благоприятному взаимному расположению альдегида **166** и ацетона, что снижало энтропийный барьер бимолекулярной реакции. Таким образом, гаптен **168**, благодаря своим превращениям в формирующемся активном центре КА, генерировал в нем все элементы, необходимые для процесса в целом. Критически важным моментом являлось образование енамина — главной движущей силы процесса альдольной конденсации. Именно образование енаминной структуры **169** указывало на успешный ход реакции антигена с генерируемым антителом. Это было использовано для первоначального мониторинга образующихся активных антител химическим методом (вместо применяемого обычно мониторинга путем иммуноферментного анализа (см. с. 1101)).

Антитела, генерированные к гаптену **168**, были подвергнуты спектральному анализу в виде комплексов с гаптеном. Предполагалось, что все комплексы, имеющие характерные для винилога карбоксимида **169b** полосы поглощения при 316 нм и, следовательно, способные к образованию енамина, будут обладать каталитическими свойствами. Отобранные таким путем два КА (38C2 и 33F12) действительно оказались высокоактивными и катализировали альдольную конденсацию альдегида **166** с ацетоном. Катализируемая реакция следовала кинетике Михаэлиса–Ментен, ингибировалась аналогом гаптена или ацетилацетоном. Эти и некоторые другие данные свидетельствовали о том, что КА действительно работает подобно природной альдолазе. Кинетические измерения показали, что данные КА ускоряют реакцию в 10⁹ раз и по активности близки к природной альдолазе.

Существенно, что действие обоих КА отличалось более широкой субстратной специфичностью, чем это характерно для природной альдолазы, катализирующей аналогичное превращение, что демонстрирует преимущество искусственного фермента. Так, КА 38C2 катализирует конденсацию **166** не только с ацетоном,¹⁷⁷ но и с другими кетонами (фтор- и хлорацетоном, бутан-2-оном, пентан-3-оном, пентан-2-оном, дигидроксиацетоном), хотя его эффективность при этом несколько ниже. При конденсации с несимметричными бутан-2-оном и пентан-2-оном проявляется значительная региоселективность: реакция протекает преимущественно по СН₂-группе кетона, в результате чего образуются разветвленные альдоли. Каталитическое действие КА в реакции альдегида **166** ограничивается только кетонами: взаимодействие с ацетальдегидом не ускоряется. Каталитическое антитело 38C2 катализирует также реакции ацетона с разветвленными аналогами альдегида **166**, например, с 3-арил-2-метилпропионым альдегидом **170**, причем с еще большей эффективностью.

Действие КА отличается высокой стереоселективностью. Так, присоединение ацетона к стереоизомерным альдегидам **170** протекает с высокой диастереоселективностью: *S*-изомер дает 4*S*,5*S*-изомер альдоля **171a** с *de*, превышающим 95%, а *R*-изомер — 4*S*,5*R*-**171b** с *de* свыше 83%. Характерно, что присоединение молекулы ацетона в обоих случаях происходит с *re*-стороны, независимо от конфигурации хирального центра в альдегиде **170**.



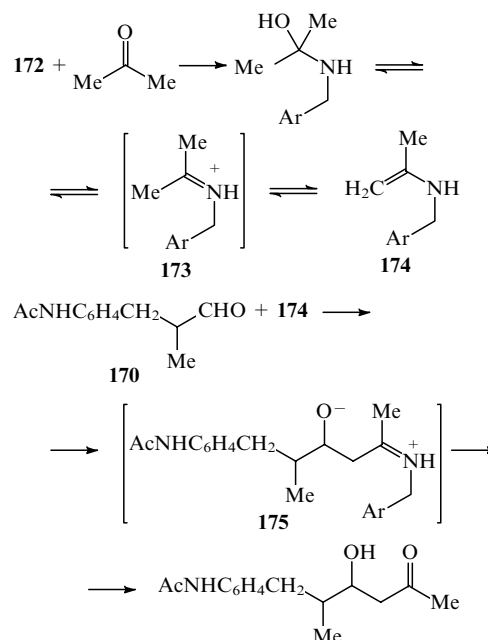
a: R¹ = Me, R² = H; b: R¹ = H, R² = Me.

Реакция присоединения ацетона к обоим изомерам **170** проходит с одинаковой скоростью, поэтому она не может быть использована для кинетического разделения рацемата альдегида **170**.

В работе⁸² была изучена еще одна возможность катализа альдольной конденсации с использованием КА. Поскольку в основе каталитического действия альдолаз лежит ускорение взаимодействия карбонильной группы альдоль-донора с остатком лизина и последующее образование нуклеофильного енамина, то возникла идея проводить альдольную конденсацию в присутствии КА к гаптену типа **77**, используя при этом как кофактор амин с подходящим значением *pK_a*. Такой амин, реагируя с КА в его активном центре, дает «модифицированное» КА, которое работает уже в соответствии с механизмом действия природной альдолазы.

Эта возможность была проверена на примере конденсации 3-арил-2-метилпропионового альдегида **170** с ацетоном в присутствии КА, генерированного к гаптену **77**, и кофактора — производного бензиламина, *p*-H₂NCH₂C₆H₄—CONH(CH₂)₂OH (**172**). Амин **172** структурно сходен с гаптеном **77** и имеет подходящее значение *pK_a* (8.5). Поэтому можно было предположить, что он вступит во взаимодействие с КА, модифицируя его должным образом. При этом реакция альдольной конденсации будет протекать через стадии образования иммониевого иона **173**, енамина **174** и продукта его конденсации с альдоль-акцептором **175** (схема 18).

Схема 18



Ar = C₆H₄CONH(CH₂)₂OH-*p*

Действительно, конденсация альдегида **170** с ацетоном в присутствии КА 72D4 и кофактора (амин **172**) при pH 7–9 протекает с высокой эффективностью и в согласии с кинетикой Михаэлиса–Ментен по отношению к каждому компоненту. Подтверждено, что реакция протекает через образование интермедиатов **173** и **175**. Использование в качестве кофактора третичного амина не дает каталитического эффекта.

Реакция стереоселективна: из рацемата альдегида **170** образуются *S,S*- и *R,S*-диастереомеры альдоля **171** с *de* 95 и 65% соответственно в соотношении 1 : 2.8.⁸

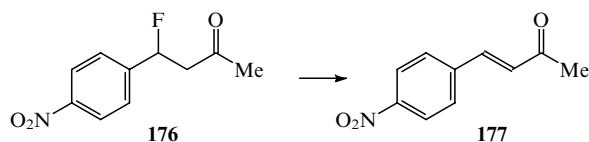
Описанные в данном разделе примеры получения искусственных альдолаз, обладающих высокой стереоселективностью и более широкой специфичностью, чем природные ферменты, — одно из наиболее ярких и впечатляющих достижений в области создания биокатализаторов нового поколения.

VII. Реакции 1,2-элиминирования (β-элиминирование)

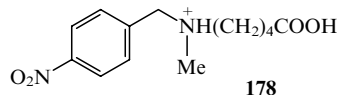
Реакции 1,2-элиминирования (дегидрогалогенирование, дегидратация и т.п.) лежат в основе многих синтетических методов, позволяющих вводить кратную связь в углеродный скелет молекулы. Каталитические антитела, катализирующие подобные превращения, интересны прежде всего тем, что в ряде случаев их применение позволяет изменить стереохимический результат реакции и получить изомеры олефинов, которые в силу энергетических запретов недоступны при некатализируемом элиминировании. Отщепление молекулы галогеноводорода, воды и других малых молекул от соседних атомов углерода с образованием кратной связи протекает чаще всего как согласованный процесс.

В настоящее время известно несколько примеров получения КА, катализирующих 1,2-элиминирование. Их действие основано на стимулировании реакции посредством введения в активный центр КА группировки, облегчающей удаление либо протона, либо заместителя (например, ОН-группы в реакции дегидратации) и тем самым инициирующей согласованный процесс элиминирования.

Примером может служить получение КА, катализирующего реакцию отщепления HF от фторкетона **176**, в результате которой образуется производное бензилиденацетона **177**.^{84, 85}



При дизайне гаптена, предназначенного для генерации активного центра КА, исходили из того, что облегчение отщепления α-протона должно ускорить реакцию. Поэтому в качестве гаптена было выбрано соединение **178**, имеющее сходство с кетоном **176** группировки. При этом место CH₂-группы в кетоне занимала аммонийная группировка. Предполагалось, что аммонийная группа будет генерировать в комплементарном месте активного центра КА группировку (вероятно, карбоксильную группу), облегчающую отщепление протона от CH₂-группы субстрата **176**.



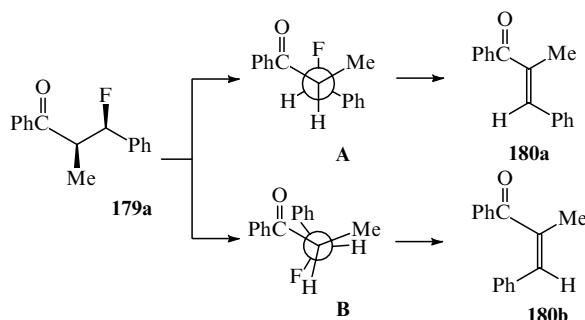
Действительно, использование соединения **178**, иммобилизованного на белке с помощью спейсерной группировки (CH₂)₄COOH, позволило получить КА, которое ускоряло реакцию отщепления HF от фторкетона **176** в 10⁴ раза. Реакция подчинялась кинетике Михаэлиса–Ментен и ингибировалась гаптенем и его аналогами. Модификация КА химическими реагентами и измерение зависимости активности КА от pH среды подтверждало наличие в активном

центре карбоксильной группы (присутствующей в виде карбоксилат-иона в остатке аспарагиновой или глутаминовой кислоты). Это было подтверждено выделением соответствующего пептида при расщеплении трипсином КА, модифицированного диазоацетамидом. Действие КА было субстрат-специфичным: распад *мета*-изомера кетона **176** активировался значительно слабее, чем *пара*-изомера. Установлено, что рацемат субстрата **176** давал смесь *цис*- и *транс*-изомеров непредельного кетона **177**.

Стереохимический аспект реакции элиминирования представляет особый интерес. Исследованы реакции всех четырех диастереомеров кетона **176**, содержащих один атом дейтерия в CH₂-группе. Поскольку в молекуле кетона **176** имеет место свободное вращение вокруг связи CHF—CH₂, то по соотношению и строению образующихся дейтерированных *цис*- и *транс*-изомеров непредельного кетона **177** можно было судить о стереохимии процесса β-элиминирования. Полученные результаты свидетельствуют о том, что β-элиминирование происходит тогда, когда молекула фторкетона **176** находится в заторможенной конформации, т.е. когда отщепляющиеся атомы F и H (или соответственно D) занимают *анти*-перипланарное положение («*анти*-элиминирование»). Отсюда можно сделать вывод, что активный центр КА способствует *анти*-элиминированию, не делая особого различия между *R*- и *S*-изомерами субстрата. Это означает, что карбоксильная группа в активном центре КА достаточно конформационно подвижна и может сближаться с тем из протонов, отщепление которого наиболее выгодно для осуществления элиминирования из *анти*-перипланарного положения.

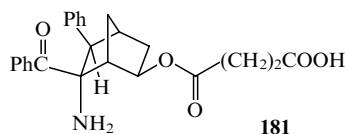
В этой связи большой интерес представляет получение КА, катализирующего элиминирование двух атомов (или групп), находящихся в «заслоненном» положении, т.е. КА, способствующего «*син*-элиминированию».⁸⁶ В отсутствие катализатора осуществление такого процесса затруднено, так как «заслоненная» конформация крайне невыгодна энергетически (из-за сильного стерического и/или электронного взаимодействия соседних группировок). Таким образом, *син*-элиминирование, приводящее к образованию *цис*-олефина, относится к так называемым «неблагоприятным» реакциям и трудно осуществимо чисто химическими методами. Чтобы реализовать подобный энергетически невыгодный (или даже запрещенный) процесс, активный центр КА должен зафиксировать молекулу субстрата в невыгодной заслоненной конформации, при этом присутствующая в активном центре КА группировка, облегчающая отщепление протона (например, карбоксильная группа), должна быть закреплена в положении, сближенном с отщепляемым протоном субстрата.

Эта идея была успешно реализована. Получено КА, катализирующее процесс *син*-элиминирования молекулы HF от кетона **179a**, приводящий к образованию *цис*-изомера. В отсутствие КА эту реакцию не удается реализовать, поскольку молекула **179a** принимает заторможенную конформацию A, в результате чего отщепляются атомы H и F, находящиеся в *анти*-перипланарном положении, и образуется *транс*-олефин **180a**.



§ Данная реакция обратима, и полученный альдол может подвергаться ретроальдольному распаду или превращаться в непредельный кетон. О влиянии пространственной структуры альдоля на его дальнейшие превращения в присутствии КА см. работу⁸³.

Чтобы направить реакцию в сторону образования *цис*-олефина **180b**, было использовано КА, генерированное к гаптону **181** с жестким бициклопептановым скелетом.

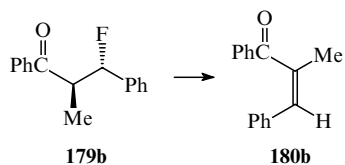


В активном центре КА гаптен **181** создает полость, в которой группы PhCO и Ph молекулы **179a** фиксируются в «заслоненном» положении по отношению к центральной связи C—C (конформация **B**). Тем самым предопределяется их *цис*-расположение в продукте элиминирования.

Положение NH₂-группы в гаптене **181** соответствует заслоненному положению протона по отношению к отщепляющемуся атому фтора в молекуле **179**. Группа NH₂, превращающаяся в условиях биосинтеза в NH₃⁺, формирует в строго фиксируемом месте активного центра КА карбоксильную группу, обеспечивающую катализ.

Каталитическое антигело, генерированное к гаптону **181**, катализирует реакцию элиминирования HF из кетона **179a**, приводящую к образованию только *цис*-олефина **180b**, т.е. обеспечивает «*син*-элиминирование» с высокой стереоспецифичностью и полностью меняет стереохимический результат реакции по сравнению с некатализируемым процессом. Реакция следует кинетике Михаэлиса–Ментен и ингибируется гаптенем **181** и его структурными аналогами, что доказывает протекание реакции элиминирования в активном центре КА. Таким образом, создаются условия, которые компенсируют затрату дополнительной энергии (~5 ккал·моль⁻¹), необходимой для осуществления «неблагоприятной» реакции *син*-элиминирования.

Интересно, что данное КА катализирует превращение кетона **179a** в *цис*-олефин **180b** более эффективно, чем превращение диастереомерного кетона **179b**.



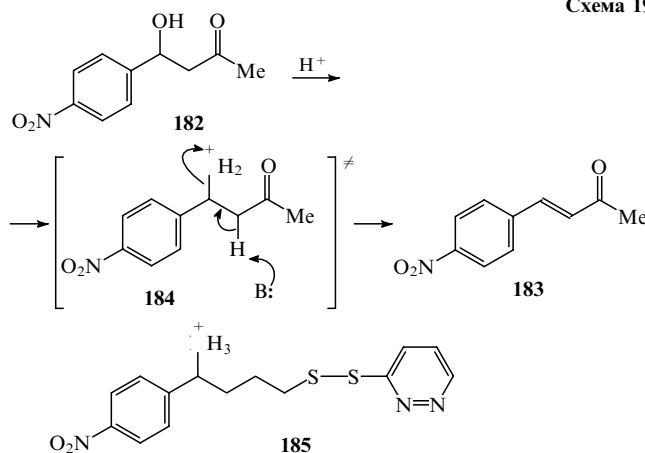
Превращение **179b** → **180b** протекает как *анти*-элиминирование. Это свидетельствует о том, что активный центр КА специфично связывается с конформером, в котором группировки PhCO и Ph (и соответственно атомы H и F) находятся в заслоненном положении, и менее приспособлен для фиксации конформеров с *анти*-перипланарным расположением этих заместителей.

Другой тип β-элиминирования — реакция 1,2-дегидратации. Один из возможных механизмов реакции дегидратации гидроксикетонов заключается в протонировании гидроксильной группы, образовании в переходном состоянии оксониевого интермедиата и последующем энергетически более выгодном элиминировании заместителя в виде молекулы воды.

Возможность получения КА, катализирующего данную реакцию, была исследована на примере дегидратации β-гидроксикетона **182** в непредельный кетон **183** (схема 19).⁸⁷

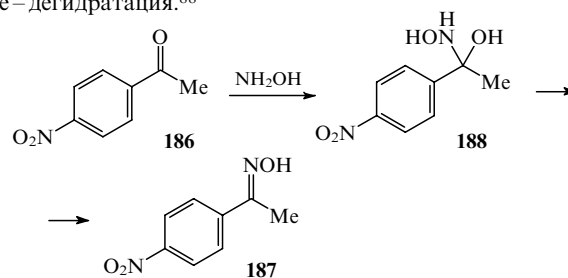
Использованный для получения КА гаптен **185** содержал аммонийную группировку на месте гидроксильной группы в кетоне **182**, призванную генерировать в комплементарной позиции активного центра образование группировки, обеспечивающей протонирование в молекуле **182** гидроксильной группы и стабилизацию переходного состояния **184**. Спейсером для связывания гаптена **185** с белком служила дисульфидная группировка.

Схема 19



Полученное КА более чем в 1000 раз ускоряло реакцию элиминирования. Его действие специфично к структуре субстрата: так, оно не катализирует дегидратацию *мета*-изомера кетона **182**. Природа группировки активного центра КА, стабилизирующей оксониевый центр в переходном состоянии, остается неизвестной.

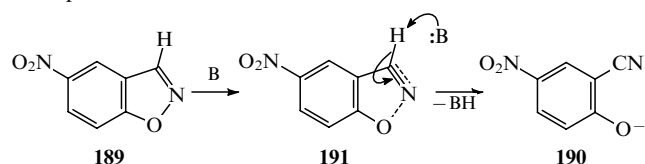
Интересно, что то же самое КА катализирует стереоселективное превращение 4-нитроацетофенона **186** в оксим **187**, которое протекает как последовательное присоединение — дегидратация.⁸⁸



Стадия дегидратации интермедиата **188** в отсутствие КА протекает стереохимически неоднозначно, приводя к смеси *син*- и *анти*-оксимов **187** в соотношении 3:1. Реакция, проводимая в тех же условиях, но в присутствии КА, ускоряется в 10⁴ раз и дает преимущественно *син*-оксим (соотношение *син*:*анти* = 9:1). Этот результат интересен тем, что под действием одного и того же КА происходит элиминирование малых молекул не только от связи C—C, но и от связи C—N, если молекулы субстратов близки по строению.

Еще одним примером реакции дегидратации, для которой получено высокоэффективное КА, является превращение бензоизоксазола **189** в производное *о*-цианофенола **190**.⁸⁹

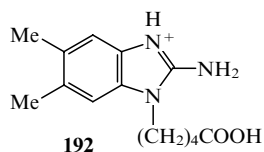
Реакция инициируется отщеплением протона с образованием частично делокализованного переходного состояния **191**. Реакция протекает как согласованный процесс *E2*-элиминирования.



Чтобы инициировать данную реакцию, активный центр КА должен содержать группировку, облегчающую удаление протона. Очевидно, такой группировкой является карбоксильная группа с подходящей кислотностью (pK_a = 7.8), расположенная комплементарно к отщепляемому протону.

В качестве гаптена было выбрано производное бензоимидазола **192**, имеющее, как и бензоизоксазол, плоское строение, а также спейсер, обеспечивающий иммо-

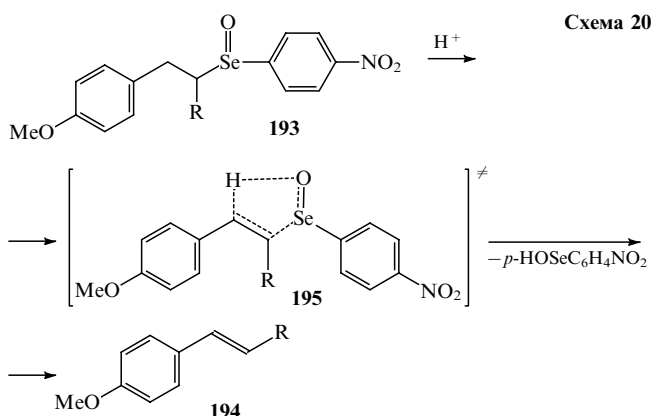
билизацию гаптена на белке. Атом N(3) в гаптене **192** протонирован и несет положительный заряд, что инициирует формирование в активном центре КА карбоксилат-иона.



Наиболее активное КА, генерированное к гаптenu **192**, ускоряло реакцию в $\sim 10^8$ раз по сравнению с реакцией, протекающей под действием ацетат-иона. Такая эффективность является одной из наиболее высоких, достигнутых в настоящее время при использовании КА.

Изучение кинетики реакции, зависимости эффективности КА от значения pH среды и результаты ингибиторного анализа указывают на то, что первоначально образуется комплекс КА с субстратом. Затем в полости активного центра под действием карбоксилат-иона происходит отщепление протона, инициирующее распад цикла. По мнению авторов,⁸⁹ столь высокий каталитический эффект достигнут благодаря правильному подбору гаптена, стимулирующего образование карбоксильной группы с подходящей кислотностью в нужном месте активного центра КА.

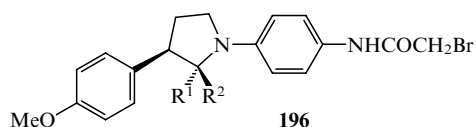
Недавно появилось сообщение⁹⁰ о получении КА, катализирующего реакцию β -элиминирования *n*-нитробензолселеновой кислоты из селеноксида **193**, приводящую к образованию ненасыщенного производного **194** (схема 20).



R = H, Me, CH₂OH, COOH.

Эта реакция, привлекающая в последнее время значительное внимание химиков-синтетиков, протекает как [2,3]-сигматропный процесс. Предполагается, что на первой стадии образуется плоское пятичленное перициклическое переходное состояние **195**, которое менее полярно, чем исходная молекула **193**.

В качестве гаптена было использовано производное пролина **196**, которое, по мнению авторов,⁹⁰ формирует относительно малополярную среду активного центра КА, благоприятствующую перициклической реакции, причем расположение в нем карбоксильной группы и бензольных колец формирует полость, в которой субстрат фиксируется в выгодной для реакции конформации.



R¹, R² = H, COOH.

Были получены два КА к *цис*-изомеру гаптена **196** (R¹ = H, R² = COOH) и одно — к *транс*-изомеру (R¹ =

COOH, R² = H). Все КА ускоряли реакцию элиминирования в несколько сотен раз (наиболее активное — в 2000 раз). Причем скорость реакции возрастала с уменьшением размера заместителя R в молекуле исходного селеноксида **193** (COOH < CH₂OH < Me < H).

Особенно интересен стереохимический результат реакции, открывающий широкие возможности для использования ее в органическом синтезе. Некатализируемая реакция элиминирования селеновой кислоты из селеноксида **193** по стерическим причинам приводит к образованию *транс*-олефинов. Реакция, проводимая в присутствии КА, полученного к *транс*-гаптenu **196** (R¹ = COOH, R² = H), приводит к превращению всего рацемического селеноксида в *транс*-олефин **194** (90%) и лишь к незначительному количеству *цис*-изомера (10%).

Напротив, реакция в присутствии КА, генерированных к *цис*-гаптenu (R¹ = H, R² = COOH), вызывает превращение лишь половины рацемата **193** (т.е. одного стереоизомера), причем одно КА дает исключительно *транс*-олефин, а другое — *цис*- и *транс*-изомеры **194** в соотношении 45:55. Для объяснения такого необычного результата авторы выдвинули предположение о том, что полость активного центра в этих КА «раздвоена», что открывает возможности для взаимодействия КА с обоими стереоизомерами. Детальный анализ кинетики реакции демонстрирует значительное влияние полярности среды и сольватационного эффекта на каталитический эффект КА.

Имеется единственная работа⁹¹, в которой приведены данные о получении КА, катализирующих процесс *цис*–*транс*-изомеризации кратной связи. В ней описано превращение *цис*-изомера α,β -ненасыщенного кетона **197** в *транс*-изомер **198** (схема 21).

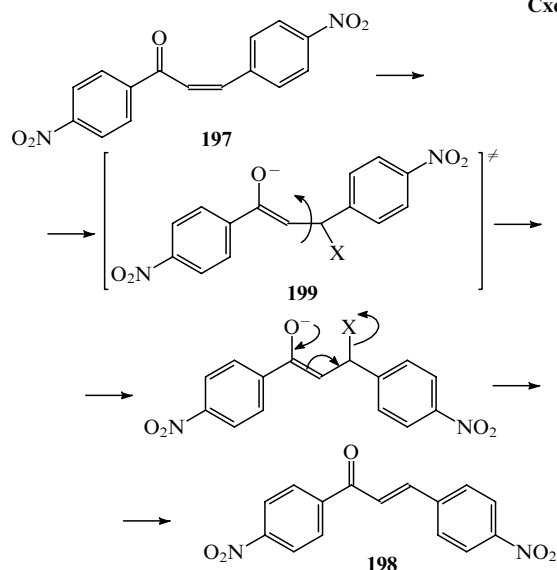


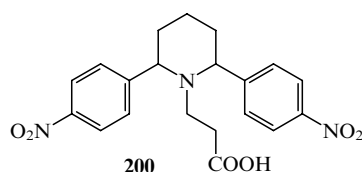
Схема 21

Считается, что изомеризация протекает путем присоединения к двойной связи основной (или нуклеофильной) группировки, сопровождающегося образованием переходного состояния **199**. После вращения вокруг возникшей ординарной связи субстрат принимает более выгодную трансoidную конформацию, и после отщепления X[–] образуется *транс*-изомер **198**.

Для осуществления такой изомеризации необходимо, чтобы активный центр КА содержал группировку X, способную присоединяться к двойной связи, а пространственная конфигурация полости КА способствовала последующему конформационному переходу.

Для получения КА был использован гаптен **200**, атом азота пиперидинового цикла которого генерирует в активном центре КА карбоксильную группу (карбоксилат-ион), а бензольные кольца в молекуле **200** формируют полость,

благоприятствующую конформационному переходу субстрата, понижая энергетический барьер процесса.



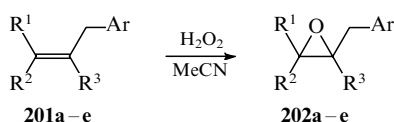
Каталитическое антитело к гаптenu **200** ускоряло изомеризацию олефина **197** в олефин **198** в $1.5 \cdot 10^4$ раз. Реакция ингибировалась *транс*-изомером гаптена **200** и практически не ингибировалась *цис*-изомером этого гаптена. Присутствие в активном центре карбоксильной группы было подтверждено опытами по химической модификации КА. Таким образом, КА играет роль обычной кислоты, понижающей энергетический барьер изомеризации.

VIII. Образование и раскрытие оксиранового цикла

Известно несколько работ,^{92–97} касающихся получения КА, катализирующих получение и раскрытие оксиранового цикла, которые могут представлять интерес для химика-синтетика.

Так, в работе⁹² описано получение КА, катализирующего синтез оксиранов посредством эпексидирования неактивированной двойной связи олефинов под действием окислителей. В данном случае наибольший интерес представляет не ускорение этой хорошо известной реакции, а возможность ее стереохимического контроля — повышения энантиоселективности. Каталитическое действие КА изучалось на примере превращения олефинов типа **201** в оксираны **202**.⁹²

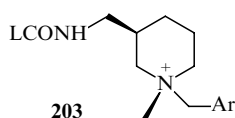
Наиболее подходящим окислителем оказался пероксид водорода в ацетонитриле, в этом случае истинным окислителем является пероксиацетимидовая кислота $\text{CH}_3\text{C}(=\text{NH})\text{OOH}$. Существенно, что эффективность данного окислителя сочетается с его мягким действием, он не разрушает белок.



$\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}-p$

Соединение	R ¹	R ²	R ³
a	Me	H	Me
b	H	—(CH ₂) ₃ —	
c	H	Me	Me
d	H	H	Me
e	Me	Me	Me

Каталитическое антитело должно облегчать пирамидализацию углеродных атомов (переход $sp^2 \rightarrow sp^3$). Активный центр КА формировался под воздействием гаптена **203**, содержащего положительно заряженный тетраэдрический атом азота, который обеспечивает появление отрицательно заряженной группировки, облегчающей кислотный катализ.



L — спейсер; $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}-p$

Одно из каталитических антител, выработанных к этому гаптenu, оказалось относительно эффективным в превращении олефинов **201** в оксираны **202**. Найдено, что эпексидирование олефинов, имеющих три заместителя при двойной

связи (**201a–c**), ускоряется в 40–125 раз, эпексидирование дизамещенного олефина **201d** — в 60 раз, а тетразамещенного олефина **201e** — в 15 раз. Более ценной оказалась высокая энантиоселективность окисления, хотя она зависела от структуры олефина. Олефины **201b** и **201c** давали соответствующие оксираны **202** с оптической чистотой 98% (с поправкой на продукт реакции, образующийся за счет параллельно протекающей некатализируемой реакции). При окислении олефина **201a** энантиоселективность составляла 67%, что, возможно, объясняется тем, что этот олефин реагирует в двух различных конформациях.

Описана⁹³ также реакция каталитического эпексидирования стирола в присутствии КА, генерированного к производному металлопорфирина. В качестве источника кислорода использовали иодозобензол. Эта работа была предпринята с целью изучения механизма действия природных оксидаз типа цитохрома.

Большой интерес представляют исследования, направленные на получение КА, катализирующих раскрытие оксиранового цикла. Такие КА позволяют регулировать региоспецифичность и энантиоселективность процесса. Каталитическое антитело такого типа было использовано⁹⁴ для ускорения реакции гидролитического раскрытия оксиранового цикла в алициклическом оксиране **204** (схема 22).

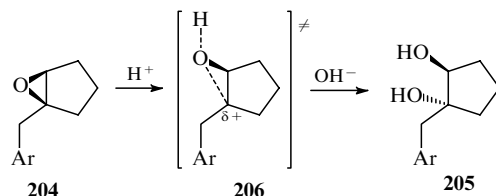


Схема 22

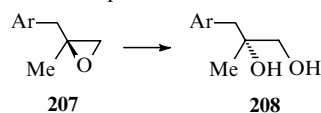
$\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Катализируемая кислотами реакция протекает через переходное состояние **206**, в котором третичный атом углерода несет избыточный положительный заряд и подвергается атаке нуклеофилом, в данном случае ионом OH^- . Каталитическая функция активного центра КА сводится к промотированию и стабилизации этого положительно заряженного центра и облегчению «пирамидализации» соответствующего углеродного атома.

Для генерации КА использовали гаптен **203**. По мнению авторов,⁹⁴ этот гаптен формирует в КА полость, комплементарную переходному состоянию, а положительный заряд на атоме азота способствует образованию отрицательно заряженной группировки, стабилизирующей избыточный положительный заряд переходного состояния.

Полученное КА ускоряло реакцию превращения оксирана **204** в 1,2-диол **205** по сравнению с реакцией, проводимой в тех же условиях, но в отсутствие КА, в 440 раз и, что особенно существенно, обеспечивало высокую энантиоселективность процесса: рацемат эпоксида **204** давал только *R,S*-диол **205** с *ee* 87%. Реакция подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен и ингибируется аналогом гаптена **203**, что подтверждает ее протекание в активном центре КА.

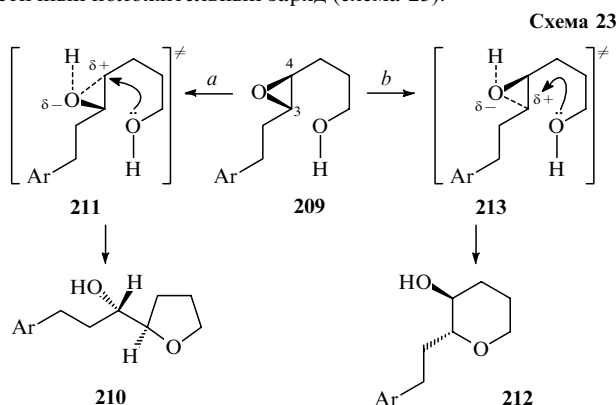
Каталитическое антитело, генерированное к гаптenu **203**, обладает широкой субстратной специфичностью. Оно катализирует также раскрытие цикла в простых эпексидах алифатического ряда, например, превращение эпоксида **207** в диол **208**. Реакция ускоряется в 100 раз. Однако в этом случае реакция лишена энантиоселективности — *R*- и *S*-изомеры **207** гидролизуются с одинаковой скоростью, а гидролиз соответствующего рацемата не приводит к избытку *R*- или *S*-энантиомера.



Разницу в поведении оксиранов **204** и **207** авторы объясняют наличием в молекуле **204** дополнительного пятичленного цикла. В данном случае имеет место более тесный контакт субстрата с активным центром КА, который был сформирован гаптеном, также имеющим циклическую структуру.

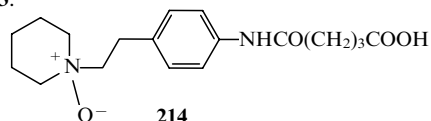
Особый интерес представляет использование КА для катализа внутримолекулярного раскрытия оксиранового цикла в эпокси спиртах, когда КА может изменить региоспецифичность реакции. Примером может служить раскрытие оксиранового цикла в эпокси спирте **209**, в результате которого образуется гетероциклическая система.

Эта реакция может протекать в двух направлениях. В отсутствие КА она идет только по пути *a* (нуклеофильная атака атома C(4) окисного кольца) и дает, в соответствии с так называемым «правилом Болдуина»,⁹⁶ производное тетрагидрофурана **210**. Очевидно, реакция протекает через переходное состояние **211**, в котором на атоме C(4) сосредоточен частичный положительный заряд (схема 23).



Ar = C₆H₄NHAc-*p*, C₆H₄OMe-*p*.

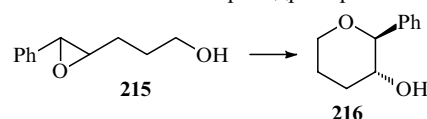
Оказалось, что в присутствии соответствующего КА можно полностью изменить ход реакции и направить ее по энергетически менее выгодному пути *b*, приводящему к тетрагидрофурану **212**. Для этого нужно создать условия, в которых реакция пойдет через переходное состояние **213**. Это было достигнуто при использовании КА, активный центр которого соответствовал переходному состоянию **213**, отличающемуся от переходного состояния **211**. В качестве гаптена было выбрано производное *N*-оксида пиперидина **214**, геометрия которого близка к геометрии переходного состояния **213**.



Гаптен **214** имеет группировку N⁺ — O[−], расположенную комплементарно атомам углерода и кислорода, несущим в переходном состоянии **213** избыточные заряды. Все это способствовало формированию в активном центре КА группировок, стабилизирующих именно это переходное состояние.

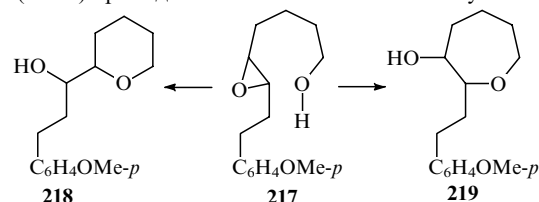
Действительно, одно из полученных КА (26D9) обеспечивало строго специфичное раскрытие оксиранового кольца и приводило к образованию только тетрагидропирана **212**. Действие этого КА отличалось также высокой стереоселективностью: только *S,S*-изомер эпокси спирта **209** превращался в *S,R*-изомер **212**. Такое изменение хода реакции в присутствии КА стало возможным благодаря комплексообразованию между активным центром КА и комплементарным ему переходным состоянием **213**, что снизило свободную энергию переходного состояния **213** и энергетический барьер реакции, при этом путь *b* оказался энергетически выгоднее пути *a*.

Имеется также краткое сообщение об аналогичном изменении под действием КА региоспецифичности реакции внутримолекулярного раскрытия эпокси спирта **215**, который в условиях обычного кислотного катализа дает только производное тетрагидрофурана, а в присутствии КА образует исключительно тетрагидропиран **216**.⁵⁴



Реакция протекает с высокой стереоселективностью — рацемат **215** дает *S,R*-изомер **216**, *R,R*-изомер эпокси спирта **215** в реакцию не вступает.

Дальнейшие исследования показали, что такое изменение региоспецифичности при циклизации эпокси спиртов — общее явление. Так, довольно неожиданно оказалось, что циклизация эпокси спирта **217**, который в обычных условиях в соответствии с правилом Болдуина превращается только в производное тетрагидропирана **218**, в присутствии того же КА (26D9) приводит исключительно к оксепану **219**.



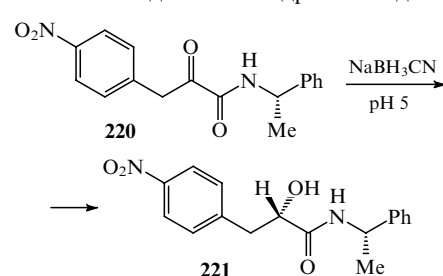
Таким образом, и в данном случае КА направляет реакцию по энергетически «невыгодному» пути.⁹⁷ Поскольку гаптен, который формировал активный центр КА, геометрически соответствовал переходному состоянию с шестичленным циклом, образование оксепана **219** кажется, на первый взгляд, неожиданным. Авторы объясняют это явление тем, что роль КА состоит прежде всего в создании в подходящем месте активного центра группировки, благоприятствующей строго специфическому раскрытию оксиранового цикла, а размер образующегося гетероциклического кольца зависит от длины и конформации алифатической цепи в эпокси спирте **217** (tether).

Приведенные примеры демонстрируют возможности, которые открывает использование КА для целенаправленного органического синтеза и разработки новых синтетических методов.

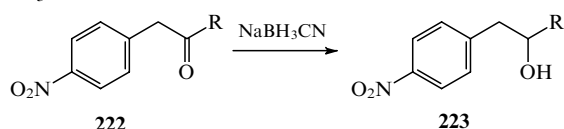
IX. Реакции восстановления и окисления

Исследования, направленные на поиск КА, катализирующих реакции восстановления и окисления, не носили широкого и систематического характера. По-видимому, это связано с тем, что существуют многочисленные химические и биохимические методы, позволяющие эффективно осуществлять эти реакции. Тем не менее получено несколько КА, катализирующих реакции восстановления карбонильных групп. Применение искусственных КА преследовало цель сделать реакции восстановления более избирательными.

Так, были получены КА, катализирующие восстановление α-оксоамида **220** в α-гидроксиамид **221**.⁹⁸

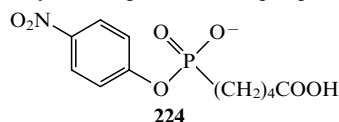


и кетонов **222** в соответствующие спирты **223** под действием NaBH_3CN .⁹⁹



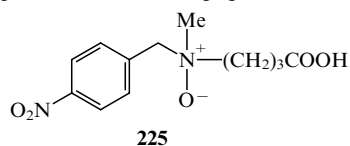
$\text{R} = \text{Et}, \text{Pr}^i, \text{Bn}$.

В первом случае в качестве гаптена было выбрано соответствующее производное фосфоновой кислоты **224**.



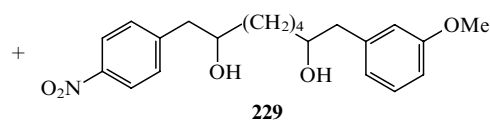
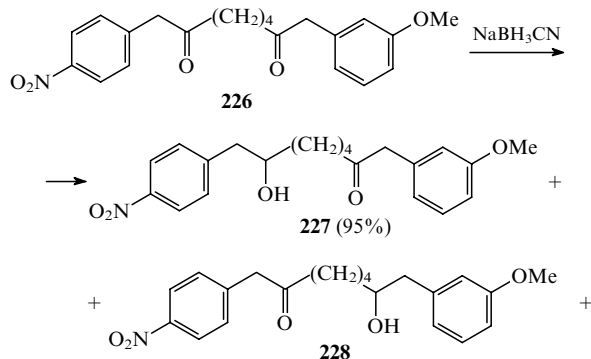
Атом фосфора в гаптене **224** находится в том же месте, что и восстанавливаемая кетогруппа в субстрате **220**. Гаптен **224** обеспечивал формирование в активном центре КА группировки, способствующей поляризации кетогруппы, а тетраэдрическая структура атома фосфора — стереоселективность нуклеофильной атаки карбонильного атома углерода гидрид-ионом в переходном состоянии. Полученное КА в 300 раз ускоряло реакцию восстановления оксоамида **220** по сравнению с некатализируемой реакцией, причем главным достоинством являлась высокая стереоселективность восстановления: в присутствии КА спирт **221** с *S*-конфигурацией получается с чистотой 99%, тогда как в отсутствие КА *R*- и *S*-изомеры образуются примерно в равных количествах.

Так как кетогруппа в кетоне **222** менее активна, чем в оксоамиде **220**, то для ускорения реакции использовали более эффективное КА, генерированное к гаптену **225**.



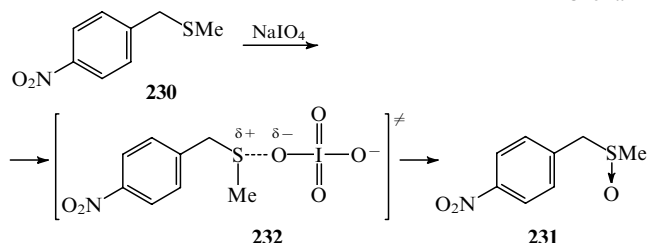
Группировка $\text{N}^+ - \text{O}^-$ в молекуле **225** обеспечивала формирование КА, в активном центре которого наряду со стабилизацией тетраэдрического переходного состояния усиливалась также поляризация субстрата, что необходимо для нуклеофильной атаки восстановителя.

Данное КА ускоряло восстановление кетогруппы в кетонах **222** примерно в 100 раз, при этом с высокой стереоселективностью (88–95% *ee*) независимо от величины алкильного заместителя образовывались спирты **223** *S*-конфигурации. Действие КА отличалось также высокой региоселективностью. Так, при восстановлении несимметричного дикетона **226** в присутствии этого КА с выходом 95% образуется *S*-энантиомер гидроксикетона **227**, тогда как другие возможные продукты восстановления — соединения **228** и **229** — образуются в незначительных количествах. Региоспецифичность КА обусловлена структурой иницирующего гаптена **225**, а именно присутствием NO_2 -группы.



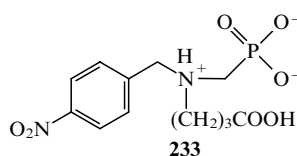
Из реакций окисления, для которых были найдены эффективные КА, следует отметить реакцию окисления сульфида **230** в сульфоксид **231** (схема 24).

Схема 24



Считают, что реакция включает атаку атома серы в сульфиде **230** атомом кислорода периодат-иона и протекает через переходное состояние **232**.

В соответствии с этими представлениями для получения КА был использован гаптен **233** — производное бензиламинофосфоновой кислоты, аминогруппа которого в условиях биосинтеза КА трансформируется в аммонийную группировку. Последняя способствует формированию в активном центре КА отрицательно заряженной группы, стабилизирующей положительный заряд на атоме серы в переходном состоянии, а остаток фосфоновой кислоты формирует в активном центре полость, связывающую периодат-ион.



Одно из генерированных к данному гаптену КА ускоряло реакцию окисления сульфида **230** в $2 \cdot 10^5$ раз и по своей эффективности приближалось к природным оксидазам, хотя и отличалось довольно низкой энантиоселективностью (~15% *ee*). Полученное КА было практически инертно к периодату. Механизм каталитического действия этого КА и структура его активного центра были установлены с помощью рентгеноструктурного анализа комплекса КА с гаптеном.¹⁰¹

К сказанному следует добавить, что катализирующие окислительно-восстановительные процессы КА нашли применение для решения некоторых вопросов биохимии и ферментативного катализа: например, для определения восстановительного потенциала флавина¹⁰² и для оценки вклада в свободную энергию связывания в активном центре КА двух фрагментов флуоресцеина.¹⁰³

Х. Другие реакции

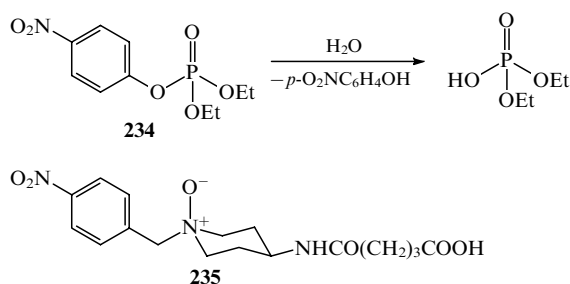
Описанные ниже КА не нашли в настоящий момент общего назначения, тем не менее они интересны тем, что демонстрируют, сколь широк круг превращений, для которых могут быть получены активные КА, и как велик потенциал этих искусственных ферментов.

1. Гидролиз фосфотриэфиров

Интерес к получению КА, катализирующих гидролиз фосфотриэфиров,¹⁰⁴ возник в связи с медицинскими и экологическими проблемами, так как фосфотриэфиры и их производные являются основой ряда пестицидов и отравляющих веществ (ОВ), а также промежуточными продуктами много-

тоннажных химических производств. Получение КА, способствующих мягкому гидролизу этих токсичных веществ, и их применение на практике может оказаться полезным инструментом при терапии отравлений пестицидами, ОВ и т.п.

Так, для получения КА, катализирующего гидролиз одного из известных пестицидов — параоксона (234), протекающий с отщеплением 4-нитрофенола, был использован гаптен 235.



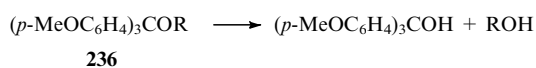
Заряды на группе $N^+ - O^-$ в молекуле 235 генерируют в полости активного центра КА группировки, способствующие протонированию и/или стабилизации отрицательного заряда на атоме кислорода фосфатной группы, а пространственная структура гаптена формирует полость, соответствующую оптимальной структуре переходного состояния.

Полученное КА ускорило гидролиз фосфата 234 в ~ 1000 раз. При этом скорость реакции линейно зависела от концентрации гидроксид-иона. Это указывает, по мнению авторов,¹⁰⁴ на то, что каталитический эффект КА достигается, скорее всего, за счет стабилизации переходного состояния. Данное КА проявляет довольно узкую специфичность к структуре субстрата. Гидролиз аналогов фосфата 234, содержащих в бензольном кольце метокси- или ацетиламиногруппу, а также циклических фосфатов, практически не ускоряется.

2. Расщепление трифенилметильных эфиров

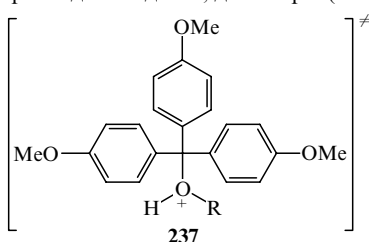
Избирательное отщепление трифенилметильной (тритильной) группы представляет определенный практический интерес, поскольку эта группировка широко используется в синтетической практике для временной защиты гидроксильной группы, особенно в синтезе нуклеозидов и углеводов. Обычно детритилирование осуществляется в достаточно жестких условиях кислотного гидролиза. Получение КА, позволяющего осуществлять детритилирование в нейтральных условиях и с должной избирательностью, представляло значительный интерес.

Детритилирование было изучено на примере расщепления эфира 236.¹⁰⁵

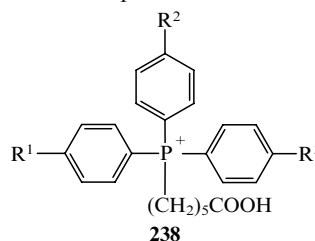


$R = (\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$.

Скоростьюопределяющей стадией реакции детритилирования трис(4-метоксифенил)метилового эфира 236 является протонирование атома кислорода, обладающего повышенной нуклеофильностью. Возникающее переходное состояние 237 распадается далее, давая трис(4-метоксифенил)метанол.



Для генерации КА, катализирующего данную реакцию, было выбрано производное трифенилфосфония 238, снабженное спейсером.



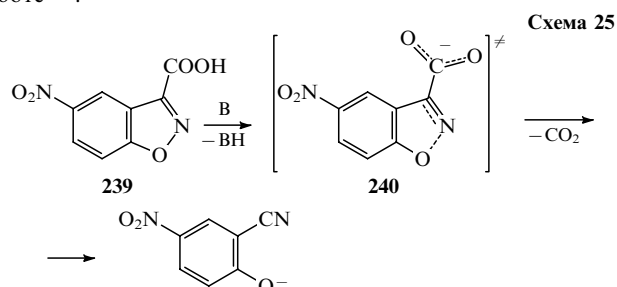
Этот гаптен имел структурное сходство с субстратом 236. Положительный заряд на атоме фосфора гаптена способствовал образованию в КА отрицательно заряженной группировки.

Полученное КА ускорило реакцию гидролиза эфира 236 ($R = (\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$) при pH 6 в 270 раз по сравнению с некатализируемой реакцией. Данное КА обладало более широкой специфичностью и проявляло активность при детритилировании аналогов эфира 236 — соединений $(p\text{-MeOC}_6\text{H}_4)_2\text{PhCO}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ и $(p\text{-MeOC}_6\text{H}_4)\text{PhC}(\text{OCH}_2)_5\text{COOH}$, ускоряя их расщепление в 200 и 230 раз соответственно. Интересно, что гидролиз тиоаналога эфира 236 также ускорялся в 70 раз, а гидролиз амина Ag_3CNHR не катализировался.

Изучение влияния pH на реакцию детритилирования соединений 236 в присутствии КА указывало, по мнению авторов,¹⁰⁵ на то, что каталитическое действие КА связано скорее не с прямым действием карбоксильной группы, имеющейся в активном центре КА, а с электростатической стабилизацией оксониевого центра переходного состояния 237 в полости активного центра. Данная работа по получению КА, катализирующих реакцию детритилирования, дальнейшего развития пока не получила, но она положила начало получению КА для других реакций, протекающих с разрывом кислород-углеродных связей (см. гл.V).

3. Реакции декарбоксилирования

Получение КА, катализирующего одну из специфических реакций — декарбоксилирование 5-нитробензо[d]изоксазол-3-карбоновой кислоты 239, сопровождающееся образованием 4-нитро-2-цианофенола (схема 25), — описано в работе¹⁰⁶.

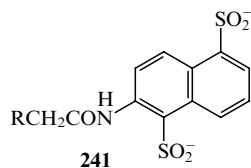


Эта реакция[†] имеет первый порядок и протекает как согласованный процесс. Известно, что она не связана с кислотно-основным катализом, но ее скорость критически зависит от характера реакционной среды. Реакция ускоряется на несколько порядков в апротонных растворителях, а также в мицеллах и в присутствии органических полимеров. Считают, что она протекает через переходное состояние 240, в котором связи частично делокализованы. Каталитическое антитело, катализирующее подобную реакцию, должно

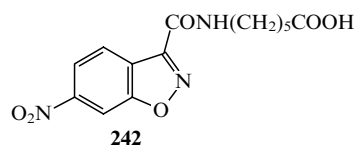
[†] Аналогичное превращение нитробензоизоксазола в производное цианофенола в присутствии КА рассмотрено в гл. VII.

иметь активный центр гидрофобной природы, в котором имеются полярные группы, облегчающие отщепление CO_2 .

Для генерации КА был использован гаптен **241**, содержащий спейсерную группировку R.

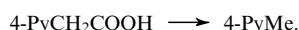


Авторы¹⁰⁶ предполагают, что нафталиновое ядро гаптена обеспечивает формирование в активном центре КА гидрофобной полости, комплементарной субстрату, а сульфогруппы продуцируют положительно заряженные группировки, облегчающие отщепление CO_2 . И хотя такая аргументация авторов в пользу выбора данного гаптена не совсем ясна, тем не менее было получено высокоэффективное КА, ускоряющее реакцию в $2 \cdot 10^4$ раз по сравнению с некатализируемым декарбоксилированием. Интересно отметить, что при использовании гаптена **242**, более комплементарного субстрату, но лишенного полярных сульфогрупп, активные КА получены не были.

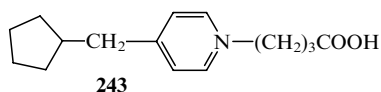


Данная реакция была подробно изучена с использованием ингибиторного анализа, спектров флуоресценции и кинетического изотопного эффекта.¹⁰⁷ Было показано, что активный центр КА действительно имеет гидрофобный характер, а каталитический эффект КА достигается за счет создания гидрофобного окружения субстрата. Этот вывод подтверждается, в частности, сравнением скоростей реакции в присутствии КА, протекающих в различных по полярности растворителях.¹⁰⁸

В работе¹⁰⁹ сообщается о получении КА, катализирующего декарбоксилирование 4-пиридилуксусной кислоты.



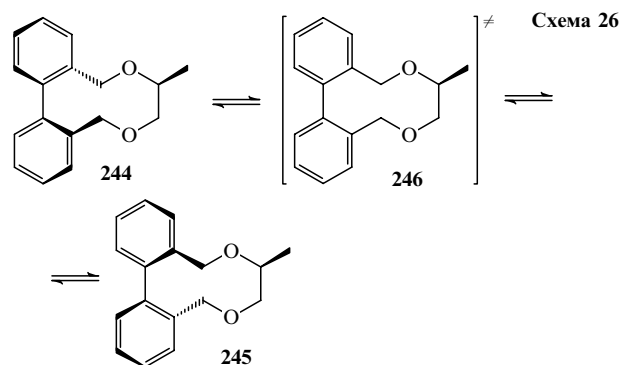
В качестве гаптена было выбрано соединение **243**, циклопентильный заместитель которого формировал гидрофобную полость в активном центре КА.



Полученное КА ускоряло декарбоксилирование 4-пиридилуксусной кислоты и некоторых ее метилзамещенных аналогов в 10^4 – 10^5 раз. Было показано, что каталитический эффект таких КА достигается главным образом созданием гидрофобного окружения вокруг субстрата в комплементарной зоне активного центра КА. Основная роль в формировании такого гидрофобного окружения принадлежит циклопентильному заместителю гаптена **243**. Получение таких КА имеет принципиальное значение, так как демонстрирует достижение каталитического эффекта за счет создания гидрофобных зон в КА. Это позволяет лучше понять принцип действия мощных природных ферментов — декарбоксилаз.

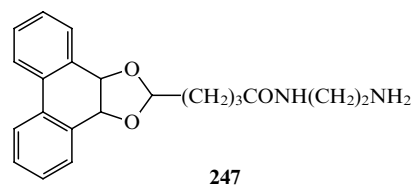
4. Изомеризация циклических производных бифенила

Изомеризация производного бифенила **244**, включенного в циклическую систему, в его диастереомер **245** требует довольно высокой (~ 20 – 26 ккал·моль⁻¹) энергии активации (схема 26).¹¹⁰

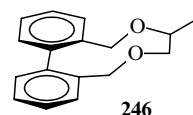


При комнатной температуре эта реакция проходит очень медленно, так как вращение фенильных ядер вокруг общей связи затруднено из-за наличия в *орто*-положениях метиленовых групп.

Авторы полагают, что действие КА связано с чисто геометрическими факторами, способствующими изомеризации, и не связано со стереоэлектронными эффектами или кислотно-основным катализом. Полагая, что изомеризация проходит через плоское переходное состояние **246**, для получения КА был выбран гаптен — производное дигидрофенантрена **247** с фиксированным плоским расположением бензольных колец.

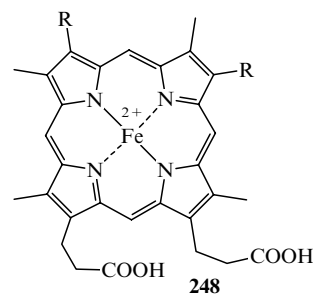


Наиболее активное из полученных КА ускоряло изомеризацию **244** в **245** примерно в 3000 раз. Это КА было подвергнуто более детальному физико-химическому исследованию. На основании полученных данных было сделано предположение, что в действительности переходное состояние **246** имеет ступенеобразную конформацию, но фенильные ядра расположены в одной плоскости.



5. Образование металлокомплексов порфиринов

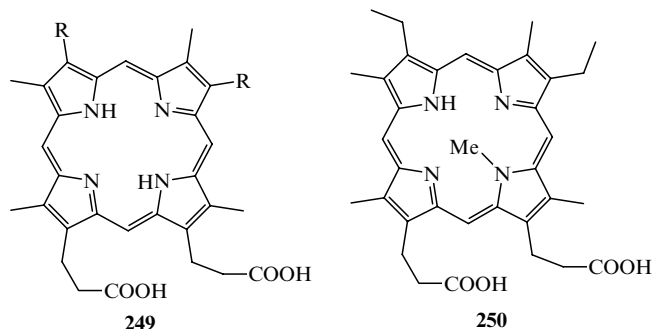
Комплексообразование порфиринов с ионами металлов является составной частью ряда процессов жизнедеятельности. Так, на заключительной стадии биосинтеза гема (**248**, $\text{R} = \text{CH}=\text{CH}_2$) происходит включение Fe^{2+} в протопорфирин IX.



Этот процесс катализируется природным ферментом — феррохелатазой — и ингибируется *N*-метилпротопорфирином IX. Считается, что ингибирующее действие последнего связано с неплоской структурой, которая похожа на струк-

туру переходного состояния, возникающего в реакции **249** → **248**, поэтому *N*-метилпротопорфирин IX конкурирует с переходным состоянием за комплексообразование с активным центром фермента.

Для генерации активного КА, катализирующего образование металлокомплексов порфиринов,¹¹¹ был выбран *N*-метилмезопорфирин **250**, в котором остатки пропионовой кислоты служили спейсером для иммобилизации.

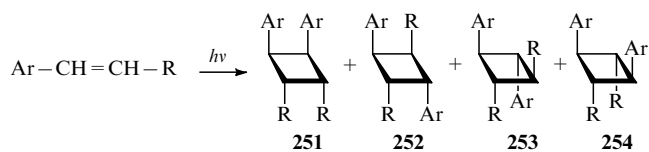


В этом случае при выборе гаптена использовали принцип имитации «напряженного переходного состояния».

Наиболее активное КА ускоряло комплексообразование дигидропротопорфирина **249** ($R = C_2H_5$) с Zn^{2+} и Cu^{2+} соответственно в 2600 и 1700 раз. Реакция следовала кинетике Михаэлиса–Ментен и ингибировалась гаптенем **250**. Каталитическое действие КА различалось по эффективности для ионов различных металлов и специфично зависело от структуры порфирина. Так, комплексообразование протопорфирина **249** ($R = CH=CH_2$) и его аналога с $R = H$ не катализировалось данным КА. Это заметно отличает действие КА от действия феррохелатазы, которая катализирует реакции и этих аналогов.

6. Фотохимические реакции

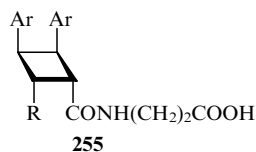
Получено несколько КА, оказывающих влияние на реакции, происходящие под действием УФ-облучения, например, димеризацию метилового эфира 4-нитрокориичной кислоты под действием УФ-облучения в растворе ацетона.¹¹² Эта реакция в обычных условиях дает смесь димеров **251**–**254**.



$Ar = p-O_2NC_6H_4$, $R = COOMe$.

Использование КА позволяет изменить соотношение двух главных изомеров **251** и **253** (0.45 : 1).

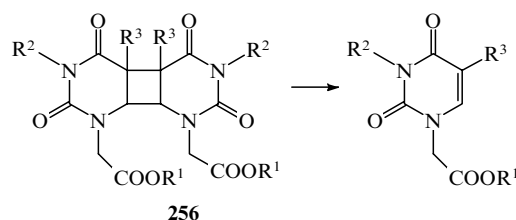
Чтобы увеличить выход изомера **251**, нужно добиться, чтобы полость активного центра КА была комплементарна пространственной структуре димера **251**. Поэтому для генерации КА был использован гаптен **255**.



При облучении метилового эфира 4-нитрокориичной кислоты в присутствии КА, генерированного к гаптену **255**, соотношение образующихся димеров **251**:**253** составило 1.13 : 1. При этом сама реакция ускорялась. Таким образом, создание активного центра, благоприятствующего соответствующей конфигурации переходного состояния, направляет реакцию в сторону образования соответствующего изомера.

Структура группировки, катализирующей сам процесс димеризации, остается пока неизвестной.

Определенный интерес представляет получение КА, катализирующего распад димера тимина **256** ($R^1 = R^2 = H$, $R^3 = Me$) под действием УФ-облучения.¹¹³



Димеризация тиминового звена ДНК под действием УФ-света является одной из причин нарушения структуры этого биополимера, что имеет важные биологические последствия. Эта реакция обратима, и чтобы «исправить» ДНК ее облучают в присутствии природных ферментов (ДНК-фототиазы).

Распад димера **256** осуществляется, очевидно, путем переноса электрона с последующим распадом, происходящим по радикальному механизму. Сенсибилизаторами электронного переноса являются производные индола, хинонов, флавинов. Поэтому для успешного катализа распада димера **256** каталитические антитела должны содержать в полости активного центра, комплементарной субстрату, группировку, способствующую сенсибилизации электронного переноса. Для генерации таких КА был использован гаптен **256** ($R^1 = NHCH_2COOH$, $R^2 = H$, $R^3 = Me$), являющийся аналогом субстрата. Эффективность полученного к этому гаптену КА была сравнима с эффективностью одного из природных ферментов — ДНК-фототиазы из *E. coli*. Действие КА специфично — распад аналога димера **256** ($R^1 = H$, $R^2 = R^3 = Me$) не катализируется. Изменения спектров флуоресценции, наблюдающиеся во время реакции, подтверждают, что сенсибилизирующей реакцию группировкой в активном центре КА является остаток триптофана.

С целью исследования механизма фотохимического распада димеров нуклеиновых оснований был изучен распад димера N_1 -карбоксиметилурацила **256** ($R^1 = R^2 = R^3 = H$).¹¹⁴ Соответствующее КА было генерировано к гаптену **256** ($R^1 = NHCH_2COOH$, $R^2 = R^3 = H$), аналогичному по структуре гаптену, использованному для получения КА, катализирующего распад димера тимина. Полученное КА ускоряло фотораспад димера урацила в 380 раз. Изучение влияния длины волны УФ-облучения показало, что за электронный перенос был ответствен остаток триптофана. Измерение изотопного эффекта при облучении C(5)- и C(6)-дейтерированных димеров урацила позволило предложить общую схему фотораспада димеров нуклеиновых оснований.

XI. Заключение

Создание искусственных катализаторов белковой природы с заданной специфичностью — одно из крупнейших достижений в области химии и биологии. За десять лет, прошедших со дня получения первых каталитических антител, в этом направлении достигнуты впечатляющие успехи. Уже получено значительное количество таких биокатализаторов. Однако, что наиболее важно, стали понятны основные принципы создания каталитических антител направленного действия и разработана стратегия их получения.

Ключевым моментом в генерировании КА является дизайн гаптена, определяющего специфичность антитела и структуру его активного центра.

В настоящее время при выборе гаптена руководствуются различными принципами, отражающими разнообразие механизмов реакций превращения органических соединений.¹¹⁵ В простейшем случае в качестве гаптена используют соединение, имеющее структуру, пространственно и элект-

ронно сходную со структурой переходного состояния, что способствует стабилизации последнего в активном центре КА. Применяют также гаптены, генерирующие в активном центре КА активные группировки, обеспечивающие кислотно-основной или нуклеофильный катализ при превращении субстрата. Для получения КА, эффективных в сигма-тропных и перициклических реакциях, используют гаптены, которые создают полость активного центра, благоприятствующую оптимальному взаимному расположению реагентов (в бимолекулярных реакциях) или обеспечивающую нужное стереоэлектронное состояние субстрата. Этим снижается энтропийный барьер на пути химического превращения (принцип «энтропийной ловушки»). В некоторых случаях гаптен призван создавать в КА локальные или достаточно обширные гидрофобные зоны, имитирующие превращение субстрата как бы в «неводной среде». На практике часто использовались гаптены, отвечающие одновременно двум или более признакам, что позволяло создать активный центр, который воздействовал на субстрат сразу в нескольких направлениях.

Новейшие подходы включают использование таких гаптен-ов, которые сами реагируют с генерируемым им анти-телом. Тем самым КА приобретает способность не только стабилизировать переходное состояние, но и имитировать сам процесс превращения субстрата (так называемая «реак-тивная иммунизация»)¹¹. Еще один подход заключается в осуществлении катализа антителом в присутствии «кофак-тора» — вещества, которое, действуя совместно с антителом (по сути, модифицируя его в процессе реакции), направляет каталитический процесс в нужном направлении.⁸²

Дальнейший прогресс в этой области будет зависеть прежде всего от новых эффективных подходов к дизайну гаптен-ов. Он связан, прежде всего, с развитием теоретиче-ской химии и с использованием расчетной техники и компью-терного моделирования для более глубокого понимания молекулярных механизмов биокатализа и уточнения меха-низма реакций, подлежащих катализу.

Широкое разнообразие реакций, для которых удалось получить каталитические антитела, свидетельствует о потен-циальных возможностях этого нового направления. На пер-вый взгляд, создается впечатление, что после должной разработки можно получить каталитическое антитело прак-тически для любого превращения органического соединения. Однако, в действительности, еще рано прогнозировать реальные границы метода.

К настоящему времени период «научной разведки» этой области можно считать завершившимся. Сейчас наряду с поисковыми исследованиями академического характера уже появляются работы, направленные на получение искусствен-ных ферментов конкретного назначения. Тем не менее еще существуют проблемы общего характера, которые требуют своего разрешения.¹¹⁶ Упомянем две из них, которые на взгляд химика-синтетика, представляются существенными.

Полученные КА по своей активности в большинстве случаев уступают природным ферментам. Одна из главных причин низкой активности КА заключается в ингибирующем действии продуктов реакции на каталитические антитела. Это сокращает «число оборотов» искусственного катализа-тора и снижает его эффективность. Понимание этого явления и умение обойти его за счет правильного подбора гаптена — насущная задача.

Как видно из представленного материала, каталити-ческие антитела очень сильно отличаются друг от друга субстратной специфичностью: одни — узкоспецифичны и эффективны только для одного субстрата, другие — напро-тив, эффективны для довольно значительного набора близ-ких по строению соединений. Первые обеспечивают высокую хемо-, регио- и стереоспецифичность конкретной реакции и исключают параллельные и побочные процессы. Вторые хороши для широкого использования и создания общего

синтетического метода. В сущности, оба типа КА имеют право на существование, и при их направленном получении очень важно было бы научиться управлять диапазоном субстратной специфичности. Для этого нужно понять меха-низм их каталитического действия, роль тонкой структуры активного центра в проявлении этой специфичности и, сле-довательно, правильно выбрать гаптен, определяющий эти свойства.

Из задач, которые предстоит решать специалистам био-логического профиля, наиболее существенными пред-ставляются усовершенствование первичного мониторинга генерированных антител и техника отбора наиболее эффек-тивных катализаторов (см., например, работу¹¹⁷). Вероятно, можно надеяться и на повышение эффективности биосинтеза антител в иммунном аппарате за счет внесения принципи-альных или технических изменений в процесс иммунизации и дальнейшего использования полученных гибридом.

Однако уже сегодня КА могут оказаться очень полезным инструментом в органическом синтезе не только для интен-сификации известных реакций, но и, что наиболее суще-ственно, для повышения специфичности и стереоселектив-ности процесса. Заманчиво получить КА для ускорения тех реакций, для которых еще не найдены природные ферменты. Пожалуй, наибольшее значение КА приобретают в осу-ществлении превращений органических соединений, кото-рые не удается провести чисто химическими средствами (из-за возникающих энергетических и/или стерических запретов). В ряде случаев КА облегчают формирование нужного пере-ходного состояния и, изменив хемо-, регио- или стереоспеци-фичность реакции, направляют ее по «запрещенному» пути, т.е., по существу, открывают дорогу новому синтетическому методу.

Для химиков использование КА открывает также новые возможности в исследовании «интимных» сторон механизма многих реакций, роли термодинамических и кинетических факторов, кислотно-основного катализа, влияния среды и т.п.

Особое место КА могут занять в биоорганической химии, в частности, в химии биополимеров, где ферменты приме-няют особенно часто.

Значительную роль изучение КА играет для понимания принципов биокатализа.¹¹⁵ Возможность получения КА направленного действия и сравнения их с близкими по действию природными ферментами, изучение молекуляр-ной структуры активного центра КА с помощью рентгено-структурного анализа и других физико-химических методов, возможность направленной химической модификации или модификации с помощью избирательного мутагенеза и многое другое делает каталитические антитела ценным инструментом для исследования механизмов ферментатив-ного катализа, структуры фермент-субстратных комплексов и их роли в протекании каталитического процесса. Вопросы специфичности действия природного фермента могут быть прослежены путем получения групп родственных ему по действию КА, установления их молекулярной структуры, выяснения закономерностей специфичность — структура и т.д. Работы в этих направлениях уже успешно развиваются и они нашли краткое отражение в этом обзоре.

Вероятно, изучение КА может внести существенный вклад в понимание других биологических проблем, относя-щихся к иммунохимии, иммунологии, биосинтезу белка и т.д. Например, известно, что работы по получению КА уже привлекаются для изучения такого специфического вопроса, как формирование и изменение структуры природных фер-ментов в процессе химической эволюции.¹¹⁸

Известны попытки использования КА в практической медицине (см. обзор¹¹⁹), например, в качестве препаратов, купирующих действие некоторых токсинов, наркотиков и т.п. Перспективным представляется также применение их при

создании лекарственных препаратов-предшественников («prodrugs»),^{120–122}

В этой связи возникает вопрос о получении КА в укрупненных масштабах. Первые разработки, касающиеся получения крупных партий КА и их использования для синтеза веществ в граммовых количествах, включая и создание лабораторной установки для этой цели, работающей в полуавтоматическом режиме, уже известны.^{53,54} В настоящее время каких-то принципиальных затруднений для использования КА в препаративном синтезе не просматривается. При современном уровне развития биотехнологии и белковой инженерии получение значительных количеств высокоочищенных каталитических антител не вызывает серьезных проблем. Разумеется, их практическое использование в укрупненных лабораторных и технологических масштабах потребует еще решения ряда вопросов и инженерных разработок. Один из вопросов касается наиболее рациональной формы их использования — в растворах, в двухфазной системе,¹²³ иммобилизованными на носителе,¹²⁴ в условиях мицеллярного катализа¹⁵ и т.д. Многие из этих проблем возникали при использовании природных ферментов, но были успешно решены. Это облегчает их решение в случае каталитических антител.

Что касается экономического аспекта, то несмотря на трудоемкость и дороговизну процесса получения таких биокатализаторов, эффект от их использования, например в асимметрическом синтезе, может полностью окупить эти затраты. Тем не менее вопрос об их использовании в крупнотоннажных процессах представляется пока преждевременным.

Литература

1. L. Pauling. *Am. Sci.*, **35**, 51 (1948)
2. W. Jencks. *Catalysis in Chemistry and Biology*. McGraw-Hill, New York, 1969
3. G. Kohler, C. Milstein. *Nature (London)*, **256**, 495 (1975)
4. A. Tramontano, K.D. Janda, R.A. Lerner. *Science*, **234**, 1566 (1986)
5. J. Pollack, J.W. Jacobs, P.G. Schultz. *Science*, **234**, 1570 (1986)
6. R.A. Lerner, S. Benkovic, P.G. Schultz. *Science*, **252**, 659 (1991)
7. E. Hazlow, D. Lane. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Lab. Press, Plain View, New York, 1988
8. G. Gafre, C. Milstein. *Methods Enzymol.*, **73**, 3 (1981)
9. E. Engvall. *Methods Enzymol.*, **20**, 419 (1990)
10. H. Suga, O. Ersoy, S. Williams, T. Tsumuraya, M. Margolies, A. Sinskey, S. Masamune. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6025 (1994)
11. P. Wirsching, J. Ashley, C.-H. Lo, K.D. Janda, R.A. Lerner. *Science*, **270**, 1775 (1995)
12. G. Siuzdak, J. Krebs, S. Benkovic, H. Dyson. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7937 (1994)
13. Р.О'Брайн. *Токсические эфиры кислот фосфора*. Мир, Москва, 1964
14. J. Jacobs, P.G. Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2175 (1987)
15. C. Durfor, R. Bolin, R. Sugawara, R. Marsey. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8713 (1988)
16. D. Tafwik, R. Zemel, B. Arad-Yellin, B. Green, Z. Eshbar. *Biochemistry*, **29**, 9916 (1990)
17. A. Tramontano, A.A. Ammann, R.A. Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2282 (1988)
18. T. Li, S. Hilton, K.D. Janda. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2123 (1995)
19. K. Landsteiner *The Specificity of Serological Reaction*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1994
20. K.D. Janda, S. Benkovic, R.A. Lerner. *Science*, **244**, 437 (1989)
21. T. Kitazume, Y.T. Lin, M. Takeda, T. Yamazaki. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2123 (1991)
22. T. Kitazume, Y.T. Lin, T. Yamamoto, T. Yamazaki. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8573 (1991)
23. D.W. Landry, Kang Zhao, G. Yang, M. Glickmann, T. Georgiadis. *Science*, **259**, 1899 (1993)
24. G. Yang, J. Chun, H. Arakawa-Uromoto, X. Wang, M. Gawiniwicz, K. Zhao, D.W. Landry. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5881 (1996)
25. Y. Iwabuchi, H. Miyashita, R. Tanimura, K. Kinoshita, M. Kinuchi, I. Fujii. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 771 (1994)
26. S. Pollack, P. Hsiun, P.G. Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5961 (1989)
27. T. Kitazuma, T. Tsukamoto, K. Yoshimura. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1355 (1994)
28. K. Shokat, M.K. Ko, T.S. Scanlan, L. Kochersperger, Sh. Yonkovich, S. Thaisrivongs, P.G. Schultz. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **29**, 1296 (1990)
29. K.D. Janda, M. Weinhouse, D. Schloeder, R.A. Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1274 (1990)
30. H. Suga, O. Ersoy, T. Tsumuraya, J. Lee, A. Sinskey, S. Masamune. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 487 (1994)
31. S. Pollack, R.G. Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1929 (1989)
32. A.D. Napper, S. Benkovic, A. Tramontano, R.A. Lerner. *Science*, **237**, 1041 (1987)
33. P. Wirsching, J. Ashley, S. Benkovic, K.D. Janda, R.A. Lerner. *Science*, **252**, 680 (1991)
34. K.D. Janda, J. Ashley, T. Jones, D. McLeod, D. Schloeder, M. Weinhouse, R. Lerner, R. Gibbs, S. Benkovic, R. Hilhorst, S. Benkovic. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 291 (1991)
35. J. Guo, W. Huang, T.S. Scanlan. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6062 (1994)
36. J. Stewart, A. Roberts, N. Thomas, E. Getzhoff, S. Benkovic. *Biochemistry*, **33**, 1994 (1994)
37. I. Fujii, F. Tanaka, H. Miyashita, R. Tamimura, K. Kinoshita. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6199 (1995)
38. J. Jackobsen, J. Prudent, K. Kochersperger, Sh. Yankovich, P.D. Schultz. *Science*, **256**, 365 (1992)
39. K.D. Janda, D. Schloeder, S. Benkovic, R.A. Lerner. *Science*, **241**, 1188 (1988)
40. M.T. Martin, T.S. Angeles, R. Sugawara, N.I. Aman, A.D. Napper, M.J. Darsley, R.I. Sanchez, P. Booth, R.C. Titmas. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6508 (1994)
41. B. Iverson, R.A. Lerner. *Science*, **243**, 1184 (1989)
42. K.D. Janda, R.A. Lerner, A. Tramontano. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4835 (1988)
43. S. Benkovic, A.D. Napper, R.A. Lerner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5355 (1988)
44. R. Hirschmann, A. Smith, C.M. Taylor, P.A. Benkovic, S.D. Taylor, K.M. Jager, P.A. Springler, S. Benkovic. *Science*, **265**, 234 (1994)
45. D. Smithrud, P.A. Benkovic, S. Benkovic, C. Taylor, K. Yager, J. Whiterington, B. Philips, P. Sprengeler, A. Smith III, R. Hirschmann. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 278 (1997)
46. J. Jackobsen, P.G. Schultz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5888 (1994)
47. R. Gibbs, S. Taylor, S. Benkovic. *Science*, **258**, 803 (1992)
48. J.-L. Reymond, K.D. Janda, R.A. Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2257 (1992)
49. J.-L. Reymond, G.K. Jahangiri, C. Stoudt, R.A. Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3909 (1993)
50. G.K. Jahangiri, J.-L. Reymond. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11264 (1994)
51. E. Keinan, S. Sinha, D. Shabat, H. Itzhaky, J.-L. Reymond. *Acta Chem. Scand.*, **50**, 679 (1996)
52. S. Sinha, E. Keinan. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3653 (1995)
53. J.-L. Reymond, J. Reber, R.A. Lerner. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 475 (1994)
54. C. Chevlin, S. Hilton, K.D. Janda. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 297 (1994)
55. S. Sinha, E. Keinan, J.-L. Reymond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11910 (1993)
56. D. Shabat, S. Sinha, J.-L. Reymond, E. Keinan. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 2628 (1996)
57. J.-L. Reymond, K.D. Janda, R.A. Lerner. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 1711 (1991)
58. J. Yu, L. Hsieh, L. Kochersperger, Sh. Yonkovich, J. Stephans, M. Gallop, P.G. Schultz. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 339 (1994)
59. T. Li, K.D. Janda, J. Ashley, R.A. Lerner. *Science*, **264**, 1289 (1994)
60. T. Li, S. Hilton, R.A. Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3308 (1995)
61. T. Li, K.D. Janda, R.A. Lerner. *Nature (London)*, **379**, 326 (1996)
62. T. Li, K.D. Janda, S. Hilton, R.A. Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2367 (1995)

63. M.Currie, C.Suckling, L.-m.Zhu, J.Irvine, W.H.Stimson. *Tetrahedron*, **51**, 8915 (1995)
64. D.Jackson, J.Jacobs, R.Sugasawara, R.Reich, P.Bartlett, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4841 (1988)
65. D.Hilvert, K.D.Nared. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5593 (1988)
66. D.Hilvert, S.Carpenter, K.D.Nared, M.-T.Auditor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4953 (1988)
67. M.R.Hayes, S.A.Stura, D.Hilvert, I.A.Wilson. *Science*, **263**, 646 (1994)
68. J.A.Shin, D.Hilvert. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 2945 (1994)
69. A.C.Braisted, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2211 (1994)
70. H.Ulrich, E.Drighers, P.G.Schultz. *Acta Chem. Scand.*, **50**, 328 (1996)
71. D.Hilvert, K.H.Hill, K.D.Nared, M.-T.Auditor. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9261 (1989)
72. A.C.Braisted, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7430 (1990)
73. C.Suckling, M.Tedford, L.Bence, J.Irvine, W.H.Stimson. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1925 (1993)
74. C.Suckling, M.Tedford, L.Bence, J.Irvine, W.H.Stimson. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 4952 (1992)
75. V.Gouverneur, K.Houk, B. de Pascual-Teresa, B.Beno, K.D.Janda, R.A.Lerner. *Science*, **262**, 204 (1993)
76. J.Yli-Kauhalauma, J.Ashley, C.-H.Lo, L.Tucker, M.Wolfe, K.D.Janda. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7041 (1995)
77. M.Rasmuni, A.Meckel, U.Pandit. *Pure. Appl. Chem.*, **68**, 2025 (1996)
78. A.Meckel, M.Rasmuni, U.Pandit. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 571 (1995)
79. Th.Koch, J.-L.Reymond, R.A.Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9383 (1995)
80. J.Wagner, R.A.Lerner, C.F.Barbas. *Science*, **270**, 1797 (1995)
81. R.A.Lerner, C.F.Barbas. *Acta Chem. Scand.*, **50**, 672 (1996)
82. J.-L.Reymond, Y.Chen. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 2575 (1995)
83. J.-L.Reymond. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 2285 (1995)
84. K.M.Shokat, C.J.Leumann, R.Sugasawara, P.G.Schultz. *Nature (London)*, **338**, 269 (1989)
85. K.Shokat, T.Uno, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2261 (1994)
86. B.Cravatt, J.Ashley, K.D.Janda, D.Boger, R.A.Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6013 (1994)
87. T.Uno, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6573 (1992)
88. T.Uno, Bing Gong, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1145 (1994)
89. S.N.Thorn, P.Damels, M.-T.Auditor, D.Hilvert. *Nature (London)*, **373**, 228 (1995)
90. Z.S.Zhou, Ning Jiang, D.Hilvert. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3623 (1997)
91. D.Y.Jackson, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2319 (1991)
92. D.Koch, J.-L.Reymond, R.A.Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 803 (1994)
93. E.Keinan, S.Sinha, A.Sinha-Bagchi, E.Benori, M.Ghozi, Z.Eshbar, B.C.Green. *Pure Appl. Chem.*, **62**, 2013 (1990)
94. S.Sinha, E.Keinan. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4893 (1993)
95. K.D.Janda, Ch.Shevlin, R.A.Lerner. *Science*, **259**, 490 (1993)
96. J.Baldwin, M.S.Wsik. *Tetrahedron*, **19**, 2929 (1982)
97. K.D.Janda, Ch.Shevlin, R.A.Lerner. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2659 (1995)
98. G.Nakayama, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 780 (1992)
99. L.Hsieh, Sh.Yankovich, L.Kochersperger, P.G.Schultz. *Science*, **260**, 337 (1993)
100. L.Hsieh, J.Stephans, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2167 (1994)
101. L.Hsieh-Wilson, P.G.Schultz, R.Stevens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5363 (1996)
102. K.Shokat, C.Leumann, R.Sugasawara. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **27**, 1172 (1988)
103. N.Janic, D.Schloeder, A.Tramontano. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6374 (1989)
104. B.Lavey, K.D.Janda. *J. Org. Chem.*, **61**, 7633 (1996)
105. B.Iverson, K.Cameron, G.K.Jahangiri, D.S.Pasternak. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5320 (1990)
106. Ch.Lewis, Th.Kramer, S.Robinson, D.Hilvert. *Science*, **253**, 1019 (1991)
107. Ch.Lewis, P.Paneth, M.O'Leary, D.Hilvert. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1410 (1993)
108. J.W.Grate, R.McGill, D.Hilvert. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8577 (1993)
109. J.Ashley, C.-H.Lo, G.P.McElhaney, P.Wirsching, K.D.Janda. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2515 (1993)
110. T.Uno, J.Ku, J.R.Prudent, A.Huang, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3811 (1996)
111. A.Cochran, P.G.Schultz. *Science*, **249**, 781 (1990)
112. A.Balan, B.Doctor, B.Green, M.Torten, H.Ziffer. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 106 (1988)
113. A.Cochran, R.Sugasawara, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7888 (1988)
114. J.Jacobsen, A.Cochran, J.Stephens, D.King, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5453 (1995)
115. P.G.Schultz, R.A.Lerner. *Science*, **269**, 1835 (1995)
116. A.Kirby. *Acta Chem. Scand.*, **50**, 203 (1996)
117. K.D.Janda, L.-C.Lo, C.-H.Lo, M.-M.Sim, R.Wang, C.-H.Wong, R.A.Lerner. *Science*, **275**, 945 (1997)
118. Ph.Patten, N.Gray, P.Y.Jang, C.B.Marks, G.J.Wedemayer, J.J.Boniface, R.C.Stevens, P.G.Schulz. *Science*, **271**, 1086 (1996)
119. G.M.Blackburn, A.Datta, L.J.Partridge. *Pure Appl. Chem.*, **68**, 2009 (1996)
120. D.Cambell, Bing Gong, L.Kochersperger, Sh.Yonkovich, M.A.Gallo, P.G.Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2165 (1994)
121. J.Smiley, S.Benkovic. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3877 (1995)
122. P.Wetworth, A.Datta, D.Blakcy, T.Boyle, L.Partridge, G.M.Blackburn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 799 (1996)
123. J.Ashley, K.D.Janda. *J. Org. Chem.*, **57**, 6691 (1992)
124. Y.Okahata, M.Yamaguchi, F.Tanaka, J.Fujii. *Tetrahedron*, **51**, 7673 (1995)

CATALYTIC ANTIBODIES: POSSIBLE APPLICATIONS IN ORGANIC SYNTHESIS

N.K.Kochetkov

N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences

47, Leninskii prosp., 117913 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)135-5328

The data on catalytic antibodies as a new generation of biocatalysts are reviewed. The principles used in the design and the methods for preparation of all presently known classes of catalytic antibodies are discussed in terms of conversions of various organic compounds catalysed by them. The data on the efficiency, regio- and stereospecificity and mechanisms of action of catalytic antibodies are presented and their possible applications in fine organic synthesis are considered.

Bibliography — 124 references.

Received 3rd February 1998