

42. Appendice 2: anticorpi catalitici

II edizione

Luigi Barbieri e Luca Valgimigli



(argomento opzionale)

42. Appendice 2: anticorpi catalitici.....	1317	42.4. INDUZIONE DELLA FORMAZIONE DI GRUPPI CATALITICI.....	1326
42.1. ANTICORPI CATALITICI NATURALI ED ARTIFICIALI.....	1319	42.4.1. Introduzione di un sito di catalisi acida/basica generale.....	1327
42.1.1. Anticorpi catalitici in fisiologia ed in patologia.....	1319	42.4.2. Avvicinamento dei gruppi reattivi.....	1329
42.1.2. Anticorpi catalitici nelle malattie autoimmuni.....	1320	42.4.3. β -eliminazione.....	1330
42.2. GENERAZIONE DI CATALIZZATORI.....	1321	42.4.4. Scissione dei dimeri di timina.....	1333
42.2.1. Usi e vantaggi degli anticorpi catalitici.....	1322	42.4.5. Stabilizzazione dello stato di transizione.....	1335
42.3. PRINCIPALI APPROCCI UTILIZZATI NEL DISEGNARE ANTICORPI CATALITICI		42.4.6. La racemizzazione della prolina.....	1336
.....	1323	42.4.7. Disegno di un anticorpo che stabilizzi lo stato di transizione.....	1336
42.3.1. Complementarietà elettronica.....	1323	42.4.8. Idrolisi di legami esterici, carbonilici ed ammidici.....	1337
42.3.2. Introduzione diretta di siti catalitici.....	1323	42.4.9. Coppie di antigeni e relativi substrati.....	1338
42.3.3. Generazione degli anticorpi.....	1324	42.4.10. Substrati idrofobici.....	1339
42.3.4. Screening.....	1325	42.4.11. Idrolisi stereo-specifica di esteri non attivati.....	1340
		42.4.12. Trasposizione o riarrangiamento di Claisen.....	1342

42.5. REAZIONI PER CUI NON SI CONOSCONO ENZIMI.....	1344	42.6.1. Reazione bi-molecolare di formazione di un legame ammidico.....	1347
42.5.1. Formazione di macrolidi.....	1344	42.7. UTILIZZO DI COFATTORI.....	1349
42.5.2. Reazioni di trasferimento di un gruppo acilico.....	1345	42.7.1. Idrolisi del legame peptidico.....	1351
42.6. REAZIONI BI-MOLECOLARI.....	1346	42.8. PRINCIPALI FONTI UTILIZZATE.....	1352



42.1. Anticorpi catalitici naturali ed artificiali

Definizione di anticorpi catalitici

Gli anticorpi catalitici, riconoscono e si legano non-covalentemente al loro antigene complementare, quindi enzimaticamente ne catalizzano la rottura od altra modificazione chimica coinvolgente l'antigene

-  Gli anticorpi con attività catalitica sono importanti in vari campi della medicina e della chimica organica:
- anticorpi catalitici naturali fisiologici
 - anticorpi catalitici insorti nel corso di malattie autoimmuni con effetti patogenetici
 - anticorpi artificiali, o indotti con vaccini, in grado di metabolizzare in vivo sostanze esogene (es.: cocaina) o endogene patogenetiche
 - anticorpi catalitici artificiali per catalizzare in vitro reazioni chimiche altrimenti non catalizzabili

42.1.1. ANTICORPI CATALITICI IN FISIOLOGIA ED IN PATOLOGIA

 In condizioni normali la produzione di anticorpi che casualmente sono dotati di attività catalitica nel sito di legame con l'antigene viene tenuta sotto controllo avviando ad apoptosi i cloni che li producono.

Sono stati osservati anticorpi catalitici anche nelle reti idiotipiche/anti-idiotipiche.

La sopravvivenza di cloni produttori anticorpi catalitici aumenta nelle malattie auto-immuni e forse in gravidanza

- es.: anticorpi in grado di degradare proteoliticamente ammassi proteici extra-cellulari

Lo sviluppo di strategie per l'introduzione di attività catalitica nei siti combinatori di un anticorpo può produrre una nuova classe di catalizzatori enzima-simili con specificità predeterminate.

42.1.2. ANTICORPI CATALITICI NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI

Tabella 42.78. Auto-anticorpi catalitici associati a malattie. VIP, vaso-intestinal peptide (peptide vaso-attivo intestinale). Dati da Nevinsky (2003), Hanson (2005), Paul (2005)

malattia	attività prevalente (substrato)
asma	proteasi (VIP)
lupus eritematoso sistemico	proteasi (tireoglobulina), DNasi, RNasi
tiroidite di Hashimoto	proteasi (tiro globulina), DNasi
mieloma multiplo	proteasi (Arg-vasopressina, protrombina), DNasi
linfomi B	DNasi
artrite reumatoide	proteasi (HLA-DR)
sclerosi multipla	proteasi, amilasi, DNasi, RNasi
emofilia A	proteasi (fattore VIII)
epatite virale	RNasi



In pazienti con malattie autoimmuni possono essere indotti spontaneamente anticorpi catalitici nei confronti di antigeni polisaccaridi, proteici/peptidici, nucleoproteici

- es: IgG capaci di idrolizzare i peptidi intestinali vasoattivi in pazienti con asma



L'individuazione di auto-anticorpi catalitici è possibile assai precocemente nello sviluppo delle malattie autoimmuni

All'esordio il repertorio è assai limitato, ma tende ad ampliarsi con il progredire della malattia autoimmune



Alcuni auto-anticorpi catalitici sono citotossici e giocano un ruolo negativo importante nella patogenesi di malattie autoimmuni



Altri auto-anticorpi catalitici possono invece avere un ruolo positivo nel degradare ammassi di proteine amiloidotiche e, probabilmente, nella difesa contro determinate malattie virali e batteriche, degradando fattori di virulenza

42.2. Generazione di catalizzatori

 Lo sviluppo di strategie per l'introduzione di attività catalitica nei siti combinatori di un anticorpo può produrre una nuova classe di catalizzatori enzimatici con specificità predeterminate

 Un elemento chiave nella sintesi di catalizzatori con specificità ed attività catalitica predeterminate di tipo enzimatico è la generazione razionale di recettori capaci di discriminare con alta specificità i ligandi

 Sono stati fatti tentativi:

- sia con la sintesi che con la funzionalizzazione di strutture con una cavità relativamente piccola
- con l'alterazione della normale funzionalità degli enzimi per modificazioni chimiche, mutagenesi diretta da oligo-nucleotidi, selezioni genetiche

I risultati non sono stati all'altezza delle aspettative teoriche

 La tecnologia degli **ibridomi** permette di sfruttare la grandissima capacità di diversità della risposta umorale del sistema immunitario nel generare anticorpi monoclonali (10^8 - 10^{10} differenti specificità) verso virtualmente ogni polimero biologico, prodotto naturale o molecola sintetica

 I principi della catalisi enzimatica sono stati applicati alla generazione di anticorpi che catalizzano una grande varietà di reazioni chimiche:

- idrolisi di esteri
- idrolisi di ammidi
- reazioni di eliminazione
- separazione fotochimica dei dimeri della timina
- reazioni di ossido-riduzione
- reazioni di lattonizzazione
- formazione di legami ammidici bi-molecolari

 In tutti i casi l'alta specificità del riconoscimento antigenico si riflette in una alta selettività di substrato

42.2.1. USI E VANTAGGI DEGLI ANTICORPI CATALITICI

 Gli anticorpi catalitici possono trovare utilizzazione come agenti terapeutici per idrolizzare selettivamente involucri proteici o di carboidrati di virus, cellule cancerose, od altri bersagli fisiologici

 Può anche essere possibile scindere o legare bio-molecole complesse come poli-nucleotidi, carboidrati e proteine permettendo la sintesi di nuove bio-molecole con caratteristiche innovative

 La disponibilità di anticorpi monoclonali in grandi quantità, può permettere il loro uso come strumenti sintetici per la produzione di nuovi farmaci o nuovi materiali

 Lo sviluppo di regole generali per generare anticorpi catalitici potrà permettere di sfruttare a fondo la diversità propria del sistema immunitario offrendo questo enorme vantaggio alla catalisi delle reazioni chimiche

42.3. Principali approcci utilizzati nel disegnare anticorpi catalitici

42.3.1. COMPLEMENTARIETÀ ELETTRONICA

-  Sfruttamento della complementarità elettronica e sterica di un anticorpo per l'aptene corrispondente. Questo approccio permette:
- la generazione di siti combinatori contenenti catene laterali amminoacidiche con funzioni catalitiche posizionate con precisione nel sito combinatorio stesso
 - la stabilizzazione degli stati di transizione nelle reazioni che porta alla riduzione dell'energia di attivazione
 - la riduzione dell'entropia di attivazione delle reazioni, orientando i partner di reazione nella conformazione di reazione
 - l'introduzione di siti di legame per cofattori nei siti di legame degli anticorpi
-

42.3.2. INTRODUZIONE DIRETTA DI SITI CATALITICI

-  Introduzione diretta di siti catalitici nel sito combinatorio dell'anticorpo attraverso modificazioni chimiche selettive, *site-directed mutagenesis*, mutagenesi e selezione
-

42.3.3. GENERAZIONE DEGLI ANTICORPI

-
-  I protocolli usati per generare anticorpi monoclonali catalitici sono quelli comunemente usati per la produzione di anticorpi monoclonali per altri usi
-
-  Gli apteni vengono coniugati ad un *carrier*, emocianina di un mollusco (*keyhole limpet hemocyanin*, KLH) per l'immunizzazione, e albumina serica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) per l'uso in ELISA (*enzyme linked immunoassay*) durante l'identificazione degli anticorpi specifici
-
-  Le strategie di coniugazione vengono disegnate in modo da essere compatibili con la struttura aptenica e la stabilità *in vivo*
-
-  L'accoppiamento generalmente coinvolge la formazione di un legame ammidico tra i gruppi carbossilici sull'aptene e gli ϵ -ammino gruppi dei residui superficiali di lisina sulle proteine *carrier*
- Tipicamente la lunghezza del legame tra l'aptene e la proteina è superiore a 6 Å, in modo da precludere ogni interferenza sterica da parte del *carrier*
- La densità degli epitopi può variare tra 4 e 30 per molecola di *carrier*
-
-  Protocolli di immunizzazione, generazione degli ibridomi e screening sono standard
-

42.3.4. SCREENING



Gli anticorpi con la specificità voluta sono quindi sottoposti a *screening* per l'attività catalitica



La purezza degli anticorpi è assolutamente fondamentale per la valutazione dell'attività catalitica, specialmente se esiste un enzima naturale con l'attività in questione

- es.: se il numero di turnover, k_{cat} , per un anticorpo catalitico è 1 min^{-1} ed un enzima naturale ha una k_{cat} di $5 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, una contaminazione con $1 \times 10^{-3} \%$ (su una base mol/mol) dell'enzima naturale potrebbe portare a credere che l'anticorpo sia catalitico mentre l'incremento di velocità della reazione osservata è dovuta all'enzima contaminante

Analisi di cinetica, specificità ed inibizione non permettono di solito di discriminare tra anticorpo catalitico ed enzima naturale

Alcune impurità (es.: ribonucleasi, adenosina deamminasi, glicosidasi) sono molto difficili da eliminare anche dopo *step* di purificazione che coinvolgono metodi per affinità

42.4. Induzione della formazione di gruppi catalitici

-
-  Le strategie per generare siti catalitici si basano sui principi di catalisi enzimatica tra cui:
- stabilizzazione degli stati di transizione
 - catalisi acida/basica generale
 - catalisi nucleofila
 - catalisi elettrofila
 - effetto di stiramento
 - effetto di prossimità
-
-  Gli enzimi naturali usano alcuni dei meccanismi sopraelencati contemporaneamente per ottenere degli incrementi di velocità della reazione considerevoli
-
-  Generalmente l'aumento di velocità catalizzato dagli anticorpi catalitici è dell'ordine di 10^2 - 10^6 volte rispetto alla velocità della reazione spontanea
- La generazione di anticorpi con accelerazioni della velocità di reazione dell'ordine di 10^8 (simile all'accelerazione prodotta dagli enzimi naturali) richiede l'introduzione di due o più strategie per la introduzione dell'attività catalitica negli anticorpi
-

42.4.1. INTRODUZIONE DI UN SITO DI CATALISI ACIDA/BASICA GENERALE

 L'introduzione di un gruppo acido o basico in un sito combinatorio per l'antigene dovrebbe essere un metodo efficace per catalizzare una varietà di reazioni

- condensazione
- isomerizzazione
- eliminazione
- idrolisi

 La elevata concentrazione effettiva del gruppo catalitico nel sito combinatorio dell'anticorpo ed un allineamento degli orbitali favorevole conducono ad una considerevole riduzione dell'entropia (ΔS^\ddagger) e dell'entalpia (ΔH^\ddagger) di attivazione della reazione

Idrolisi dell'aspirina



La velocità di idrolisi catalizzata dell'aspirina è 100 volte maggiore della velocità della reazione non catalizzata

Questa accelerazione della velocità viene ottenuta per catalisi basica generale da parte del gruppo carbossilico in posizione orto dell'aspirina

I due aspetti chiave in questa forma di catalisi sono

- la forza della base (pK_a dell'acido coniugato)
- la posizione della base relativa al gruppo che viene idrolizzato

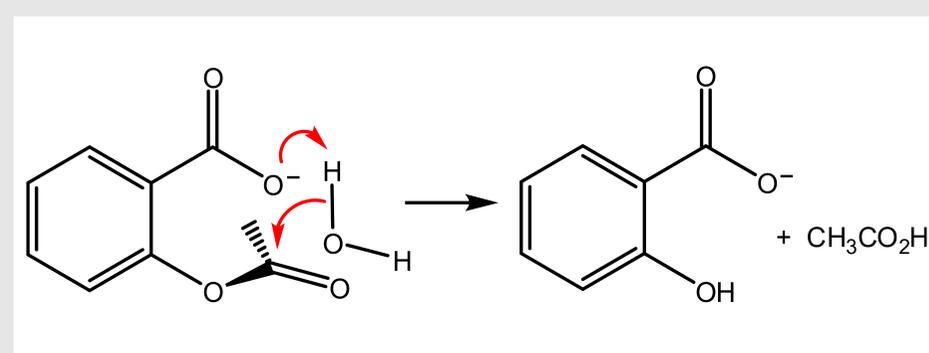


Figura 42.1. Idrolisi dell'aspirina



Se il gruppo catalitico (A) è libero in soluzione e non è legato covalentemente al gruppo da idrolizzare (B), allora la velocità della reazione è:

$$v_1 = k_1[A][B]$$

dove la costante di reazione k_1 è espressa come $M^{-1}s^{-1}$

Se (A) è unita covalentemente a (B) l'equazione della velocità diventa:

$$v_2 = k_2[AB]$$

dove le dimensioni della costante sono s^{-1}

Il rapporto tra le costanti k_2/k_1 per le rispettive equazioni mono-molecolare e bi-molecolare dà un valore (13 M) per la molarità effettiva del carbossile catalitico

Cioè sarebbe necessaria una concentrazione 13 M di carbossile esterno per dare lo stesso ordine di velocità di reazione dell'aspirina

42.4.2. AVVICINAMENTO DEI GRUPPI REATTIVI

Argomenti teorici suggeriscono che accelerazioni equivalenti a 10^8 M possono essere ottenuti per avvicinamento dei gruppi reattivi nei siti attivi degli enzimi

La **complementarietà elettrostatica** tra apteni ed antigeni può essere usata per introdurre un gruppo carbossilico catalitico nel sito combinatorio dell'anticorpo

Es.:

- residui carichi negativamente di aspartato o glutammato si trovano nei siti combinatori di anticorpi prodotti contro il catione *p*-azobenzene-N,N,N-trimetil-ammonio
- all'opposto residui di arginina e lisina carichi positivamente sono stati identificati nei siti combinatori degli anticorpi indotti contro il *p*-azobenzoato, che è carico negativamente

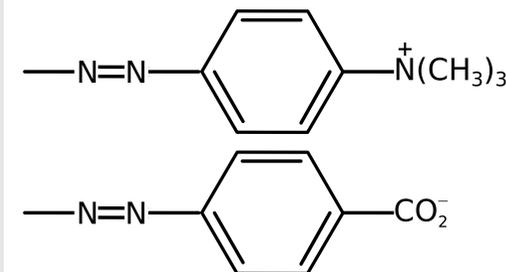


Figura 42.2.
p-azobenzene-trimetilammonio (in alto); *p*-azobenzoato (in basso)

Oltre a forze elettrostatiche, anche interazioni idrofobiche e legami idrogeno possono essere usati per indurre determinati aminoacidi nel sito combinatorio degli anticorpi; es.:

- un triptofano è stato osservato in stretta sovrapposizione π con l'anello arilico di apteni contenenti 2,4-dinitrofenile

Il poter predire la natura di queste interazioni complementari permette la generazione razionale di siti combinatori anticorpali con proprietà catalitiche

42.4.3. β -ELIMINAZIONE

 Le isomerizzazioni, le eliminazioni e molte reazioni di condensazione implicano la rimozione di un protone da un atomo di carbonio

Queste reazioni sono di grande importanza in molte trasformazioni biologiche

 In generale gli enzimi che catalizzano queste reazioni usano gruppi carbossilici o imidazolici come basi catalitiche per deprotonare il substrato

β -eliminazione di HF da β -fluorochetone

☞ L'aptene apt1 è stato usato come immunogeno per generare un anticorpo che catalizzasse la eliminazione di HF dal β -fluorochetone

La posizione del gruppo ammonio nell'aptene corrisponde alla posizione del protone allontanabile nel substrato e dovrebbe indurre un carbossile complementare catalitico a distanza di legame

L'anello *p*-nitrofenilico è stato incluso per fungere da elemento di riconoscimento comune tra l'aptene ed il substrato

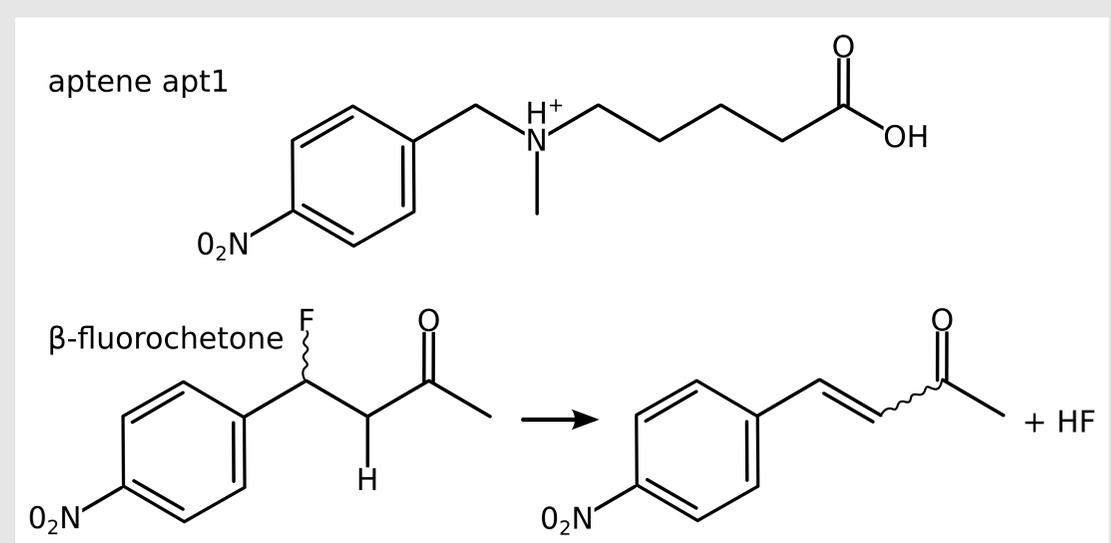


Figura 42.3. Aptene apt1 (sopra); reazione di eliminazione di HF da β -fluorochetone

☞ Inoltre la sostituzione dell'aptene con il substrato nel sito combinatorio dell'anticorpo intende produrre un aumento della pK_a del gruppo carbossilico catalitico (con incremento dell'attività catalitica) poiché viene persa una interazione salina a ponte

☞ Di sei anticorpi leganti l'antigene prodotti, quattro accelerarono la reazione sopra descritta e la loro azione era inibita dall'aptene

L'inibizione competitiva da parte dell'aptene indica che la reazione catalitica è avvenuta nel sito combinatorio dell'antigene

Cinetica della reazione di β -eliminazione di HF da β -fluoroacetone

 La cinetica della reazione catalizzata da uno di questi anticorpi obbediva alla legge di Michaelis-Menten, indicando un legame reversibile al substrato seguito da una catalisi mono-molecolare essenzialmente irreversibile

L'incremento di velocità di reazione dovuto all'anticorpo catalitico era di 8.8×10^4 rispetto alla velocità di fondo in presenza di ione acetato

Un incremento di tale ampiezza rappresenta il contributo apportato alla velocità di reazione della vicinanza del substrato e della presenza di un gruppo catalitico nel sito combinatorio dell'anticorpo

Questo valore è simile all'incremento di velocità attribuibile ai catalitici della nucleasi stafilococcica e della tripsina

L'anticorpo catalitico discriminava tra il substrato in forma *p*-nitro ed *m*-nitro per un fattore 10 espresso come velocità di reazione

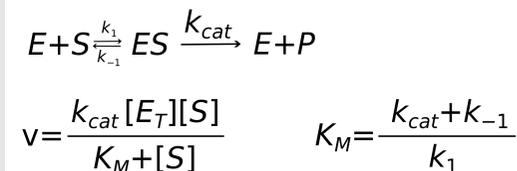


Figura 42.4. Costanti della reazione

K_M , la costante di Michaelis, è uguale alla concentrazione del substrato (S) che corrisponde alla metà della velocità massima ($k_{cat} [E_T]$)

E_T è la concentrazione totale dell'enzima

k_{cat} è la costante mono-molecolare della velocità dello step catalitico

La k_{cat} e la K_M per il substrato furono calcolate in 0.2 s^{-1} e $182 \text{ } \mu\text{M}$, rispettivamente

In generale i valori di K_M di anticorpi catalitici sono nello stesso range di quelli degli enzimi

 Studi di modificazione chimica hanno dimostrato che un gruppo carbossilico era responsabile della catalisi. In assenza dell'inibitore, la modificazione chimica selettiva con un reagente specifico per i gruppi carbossilici bloccava completamente l'attività catalitica dell'anticorpo.

Quando l'inibitore era presente, l'attività era conservata a causa della protezione del gruppo carbossilico da parte dell'inibitore stesso nel sito combinatorio dell'anticorpo.

42.4.4. SCISSIONE DEI DIMERI DI TIMINA

-  I dimeri di timina sono il danno primario di foto-lesione al DNA dovuto a raggi UV. L'enzima di riparazione, DNA fotoliasi, catalizza la reazione di ciclo-conversione luce-dipendente a timina
 -  Da sistemi modello è noto che composti come indoli, chinoni e flavine possono fotosensibilizzare la reazione (accelerare in presenza di luce), seppure con scarsa efficienza, accettando o donando reversibilmente un elettrone dal o al dimero generando un radicale anione e un radicale catione, rispettivamente, i quali ultimi possono andare incontro a facile apertura dell'anello
 -  Sono stati indotti anticorpi contro il derivato planare del dimero di timina (nella timina R=OH)
L'esteso sistema π dovrebbe consentire un appaiamento stretto π con gli aminoacidi aromatici (es.: triptofano, fenilalanina, etc.) nel sito combinatorio dell'anticorpo
-

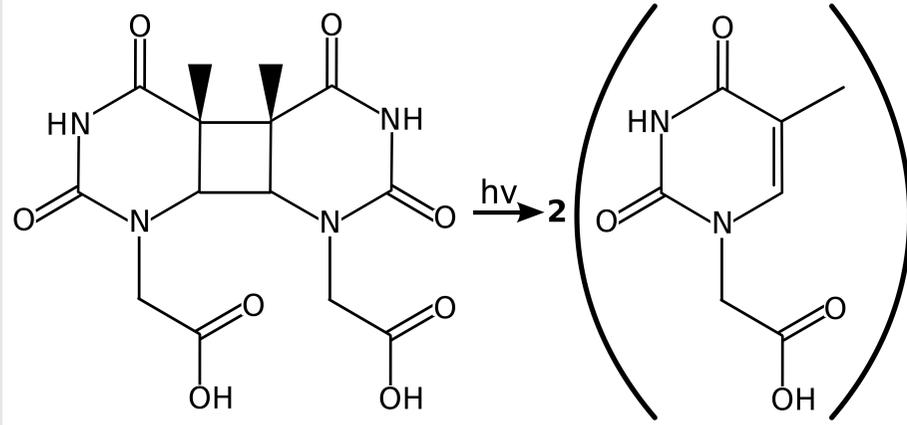


Figura 42.5. Ciclo-reversione da dimero di timina a 2 timine

Un triptofano appropriatamente posizionato dovrebbe accelerare sensibilmente la ciclo-reversione da dimero di timina a 2 timine

ed in effetti 5 su 6 anticorpi generati contro l'aptene sopra descritto incrementavano la velocità della reazione luce-dipendente



Un analogo metilato del substrato non veniva modificato anche a concentrazioni elevate, dimostrando l'alta specificità mantenuta

D'altra parte anticorpi contenenti triptofano nel sito combinatorio ma non prodotti contro l'aptene in questione non erano in grado di catalizzare la reazione

Ad intensità di luce non saturante i valori misurati di k_{cat} e K_M avevano valori simili a quelli misurati per la fotoliasi di *Escherichia coli*



L'alta frequenza di successi nel generare anticorpi catalitici sfruttando la complementarità π - π , suggerisce che questo approccio potrebbe essere facilmente generalizzabile

42.4.5. STABILIZZAZIONE DELLO STATO DI TRANSIZIONE



Si definisce stato di transizione la specie con più alta energia che si produce durante una reazione

Mentre le specie intermedie si trovano in buche di energia libera e corrispondono a strutture nelle quali i legami sono completamente formati o completamente rotti, la struttura ipotetica dello stato di transizione corrisponde a specie nelle quali i legami sono parzialmente formati e parzialmente rotti ed ha una vita media nell'ordine di quella della vibrazione di legame (10^{-13} sec)

Molti enzimi si sono evoluti fornendo un ambiente del sito attivo che è stericamente ed elettronicamente complementare allo stato di transizione, l'energia del quale determina la velocità di reazione

Il sito attivo stabilizza lo stato di transizione, riducendone l'energia e, di conseguenza, riducendo l'energia libera di attivazione (ΔG^\ddagger) per la reazione. Il risultato è un incremento della velocità della reazione

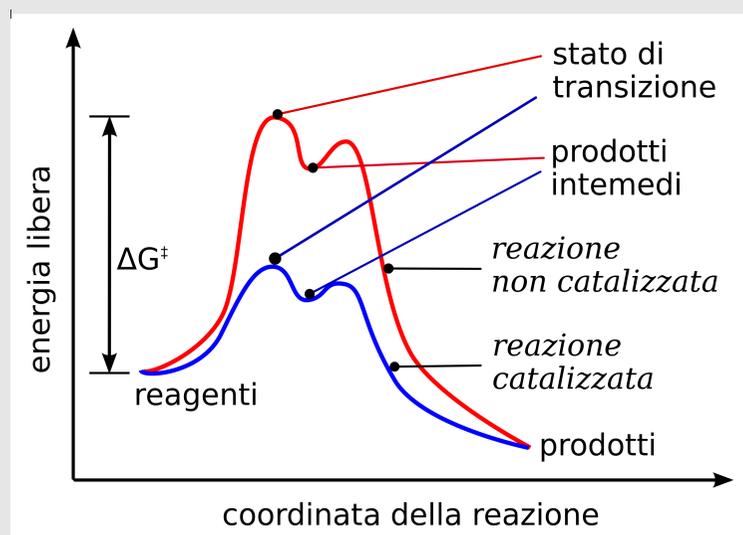


Figura 42.6. Stato di transizione

L'energia libera di attivazione (ΔG^\ddagger) è la differenza di energia tra i reattivi e lo stato di transizione

42.4.6. LA RACEMIZZAZIONE DELLA PROLINA



La racemizzazione della prolina da parte dell'enzima prolina racemasi procede attraverso uno stato di transizione che porta alla formazione di un intermedio carbocatione planare trigonale

Lo stato di transizione ha una geometria simile a tale intermedio (carbocatione planare trigonale)

I due analoghi planari dello stato di transizione sono legati dall'enzima 160 volte più strettamente della prolina, riflettendo la complementarità dell'enzima per la configurazione dello stato di transizione

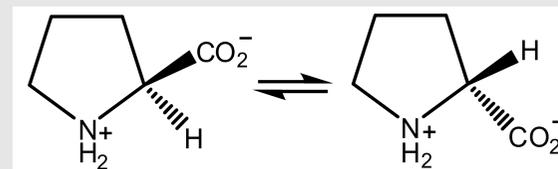


Figura 42.7.
Racemizzazione
della prolina

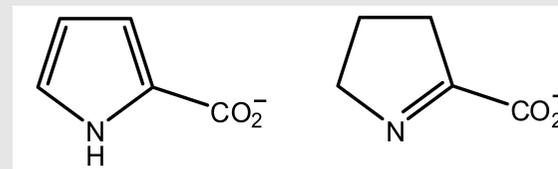


Figura 42.8.
Analoghi planari
dello stato di
transizione

42.4.7. DISEGNO DI UN ANTICORPO CHE STABILIZZI LO STATO DI TRANSIZIONE



Il disegno di un anticorpo che tragga vantaggio dalla stabilizzazione dello stato di transizione per accelerare una reazione richiede un immunogeno che assomigli strettamente allo stato di transizione per la reazione stessa

Poiché gli stati di transizione non sono specie chimiche definite ed isolabili, si devono usare analoghi stabili

Questi analoghi sono in molti casi derivati da classi note di inibitori enzimatici

Poiché gli anticorpi vengono prodotti verso analoghi geometrici ed elettronici degli stati di transizione, essi dovrebbero avere una minore affinità verso i reagenti ed i prodotti permettendo la libera diffusione di questi ultimi dal sito combinatorio

42.4.8. IDROLISI DI LEGAMI ESTERICI, CARBONILICI ED AMMIDICI

☞ La tappa limitante nelle reazioni di idrolisi di esteri e carbonati è la formazione di strutture di transizione tetraedriche cariche negativamente

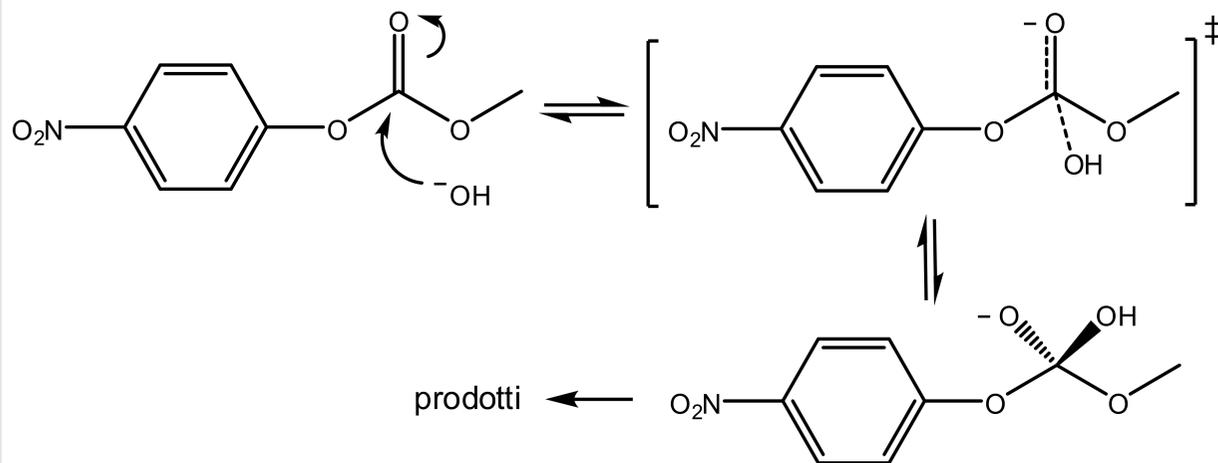


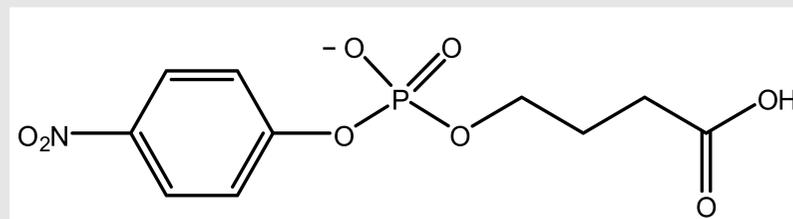
Figura 42.9. Idrolisi di esteri e carbonati

Un analogo stabile di questa struttura si forma per sostituzione del carbonio centrale tetraedrico con un fosforo centrale tetraedrico

Poiché un tipico legame singolo P-O è il 10-15 % più lungo di un singolo legame C-O, questi analoghi sono piuttosto simili allo stato di transizione che porta all'intermedio tetraedrico carico negativamente; più simili di quanto non lo siano all'intermedio stesso, poiché nello stato di transizione i legami sono più lunghi in quanto solo parzialmente formati

Questi composti sono potenti inibitori di enzimi proteolitici

Figura 42.10. Analogo stabile di struttura di transizione tetraedrica



42.4.9. COPPIE DI ANTIGENI E RELATIVI SUBSTRATI

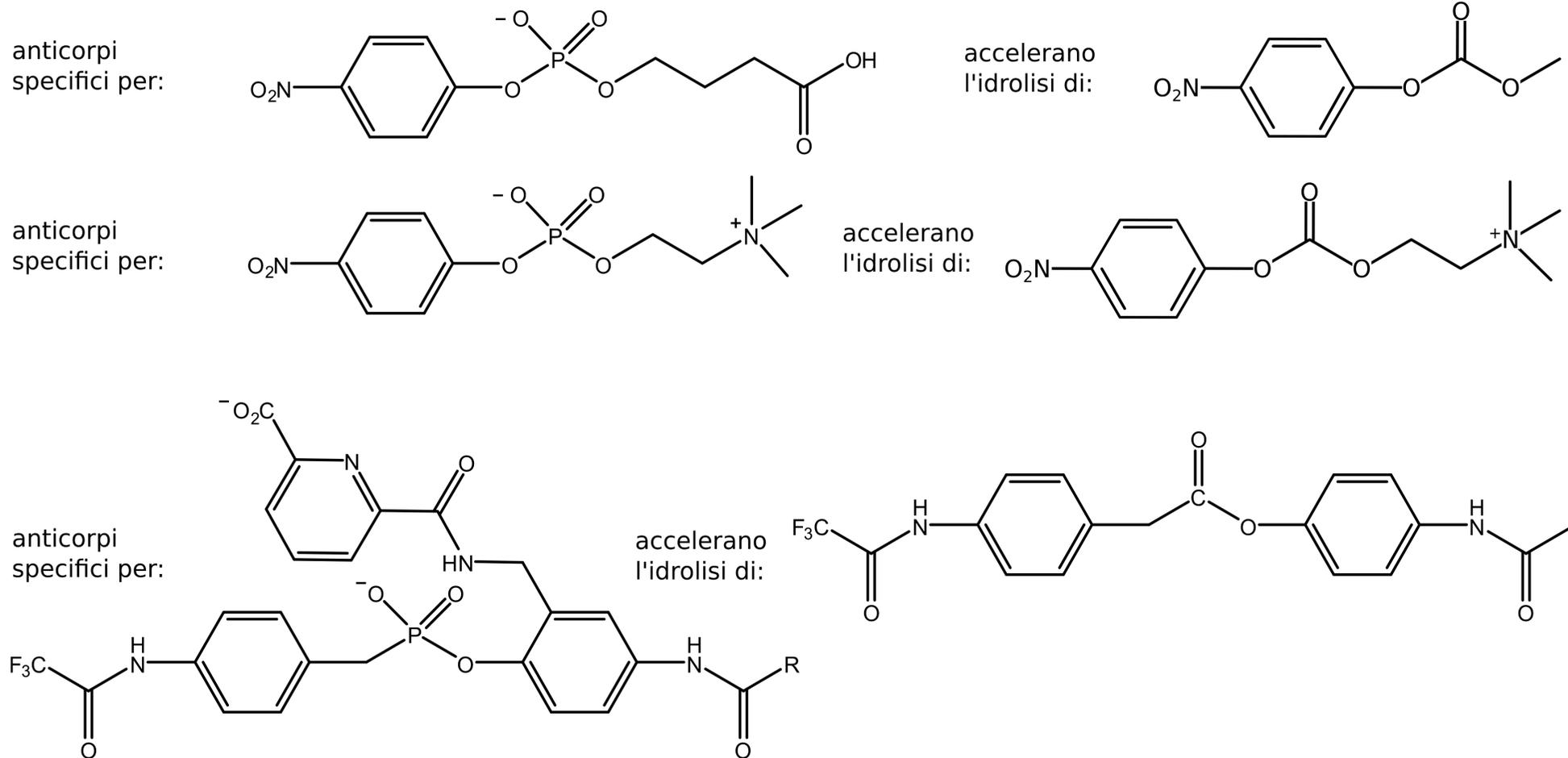


Figura 42.11. Coppie di antigeni e relativi substrati

In ciascun caso si osservò inibizione competitiva da parte dell'aptene specifico ed una grande specificità

La maggiore affinità di questi anticorpi verso l'aptene rispetto al substrato evidenzia che questi anticorpi effettivamente stabilizzano lo stato transizione

42.4.10. SUBSTRATI IDROFOBICI



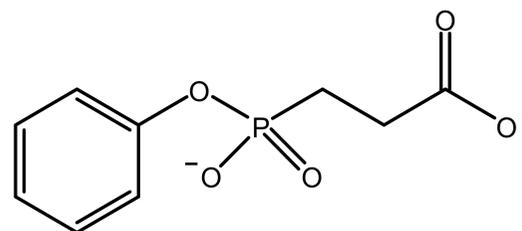
Anche substrati non solubili in acqua possono essere idrolizzati da anticorpi catalitici



I valori di k_{cat} e la K_M di un anticorpo solubilizzato in isoottano in micelle inverse (in presenza di un detergente) erano di 3.89 min^{-1} e $569 \mu\text{M}$, rispettivamente.

Il rapporto tra acqua e detergente (W_o) ottimale per la catalisi mediata da anticorpo è notevolmente più alto di quello generalmente ottimale per altri enzimi, in buon accordo con il maggior peso molecolare dell'anticorpo

anticorpi specifici per il fenil fosfonato



hanno accelerato l'idrolisi in micelle inverse di:

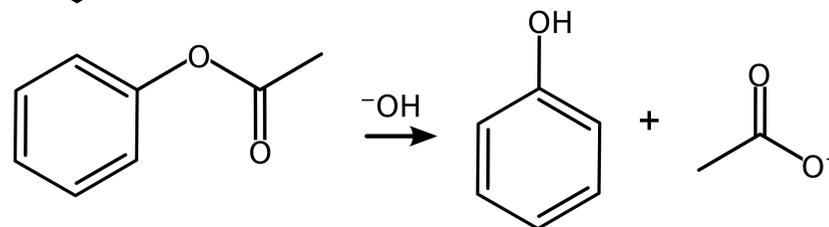


Figura 42.12. Reazione con un substrato idrofobica

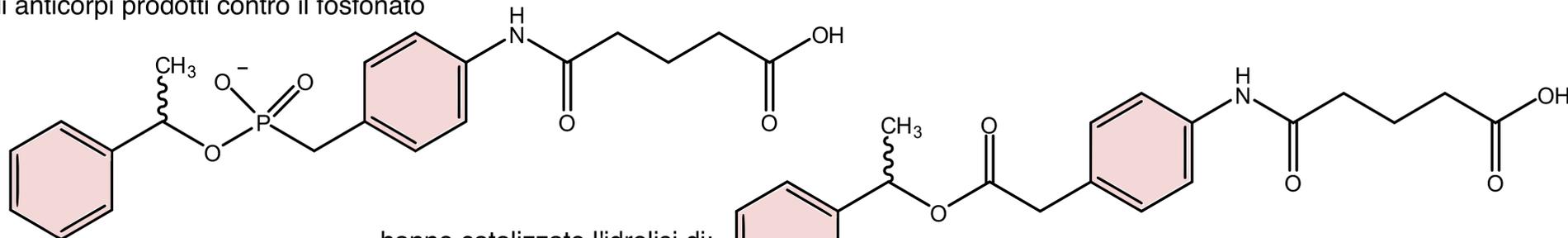
Le micelle inverse si formano quando misture di acqua/surfactanti vengono dissolte in solventi non miscibili in acqua



La estensione della catalisi mediata da anticorpi a substrati insolubili in acqua con l'uso di micelle inverse è in grado di ampliare moltissimo i possibili utilizzi di questa strategia

42.4.11. IDROLISI STEREO-SPECIFICA DI ESTERI NON ATTIVATI

gli anticorpi prodotti contro il fosfonato



gli anticorpi prodotti
contro il fosfonato

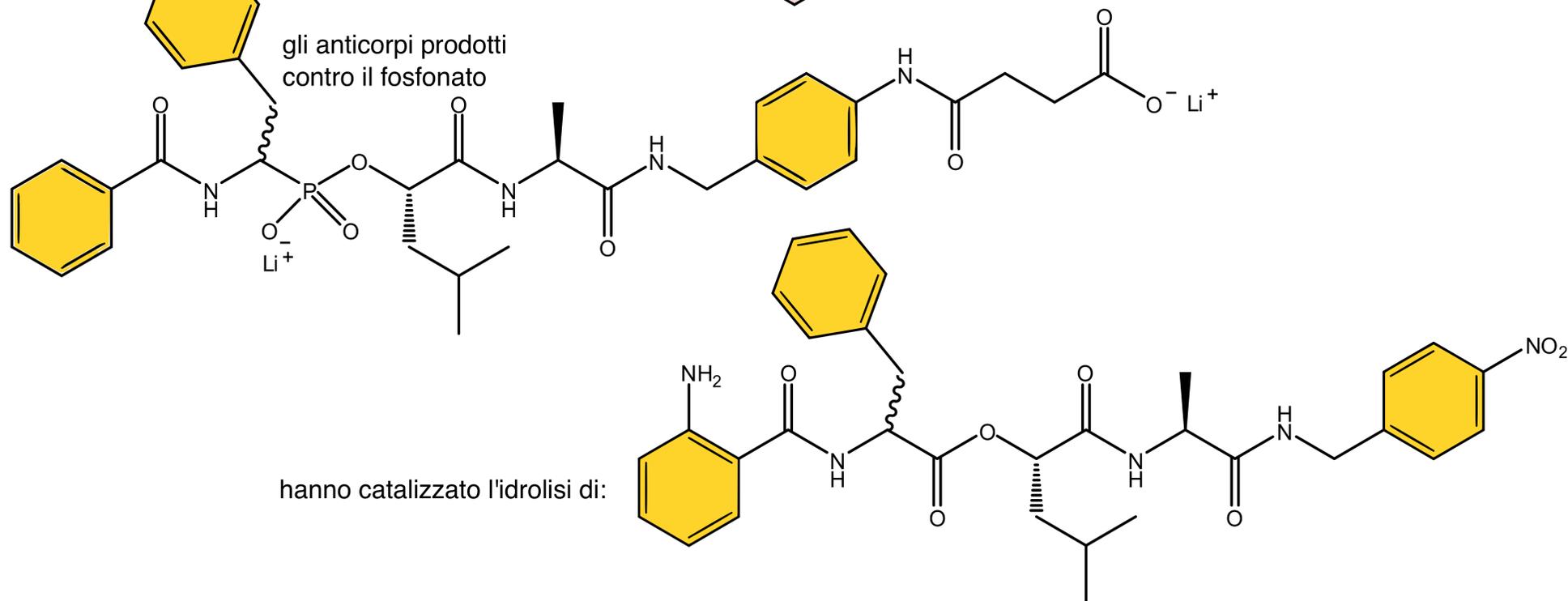


Figura 42.13. Coppie di antigeni e relativi substrati

☞ In entrambi i casi descritti nella figura precedente gli anticorpi erano stati generati contro una miscela 50/50 di entrambi gli stereoisomeri

La specificità tra i due stereoisomeri era superiore al 98%

☞ Dei 25 anticorpi specifici per il tripeptide fosfonato, 18 hanno accelerato l'idrolisi del corrispondente substrato estere

Tutti i 18 anticorpi catalitici hanno mostrato una assoluta preferenza per l'isomero D-fenilalanilico: la selettività tra D- e L-fenilalanina in questo substrato era superiore al 99.5%

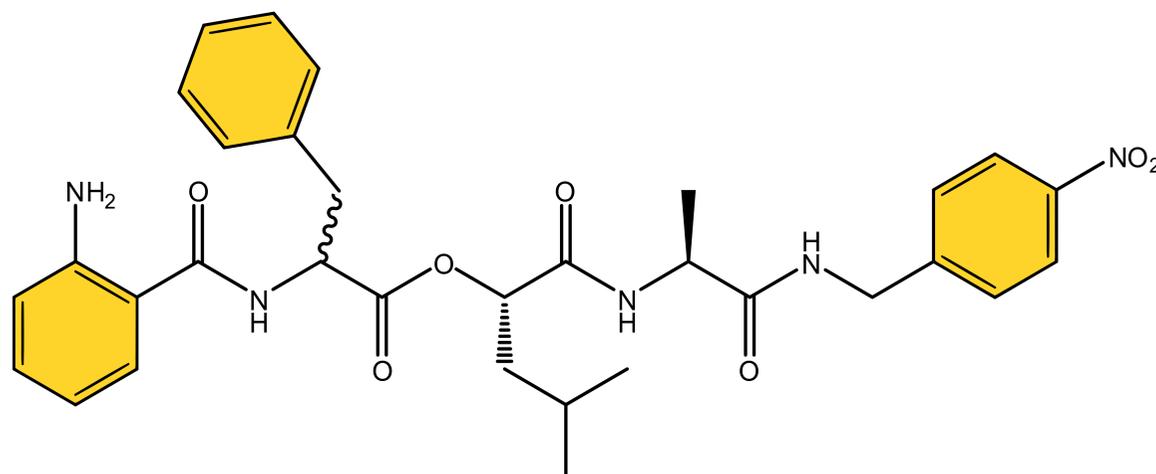


Figura 42.14. Tripeptide trifosfato

Si noti che l'aptene contiene anche gruppi fluorogenici e quenching all'estremità amminica e carbossilica, rispettivamente

Questi gruppi permettono di seguire l'idrolisi del substrato osservando l'aumento di fluorescenza che si ha quando il gruppo fluorescente 2-ammino benzoico viene separato dal gruppo 4-nitrobenzilammidico che è quenching

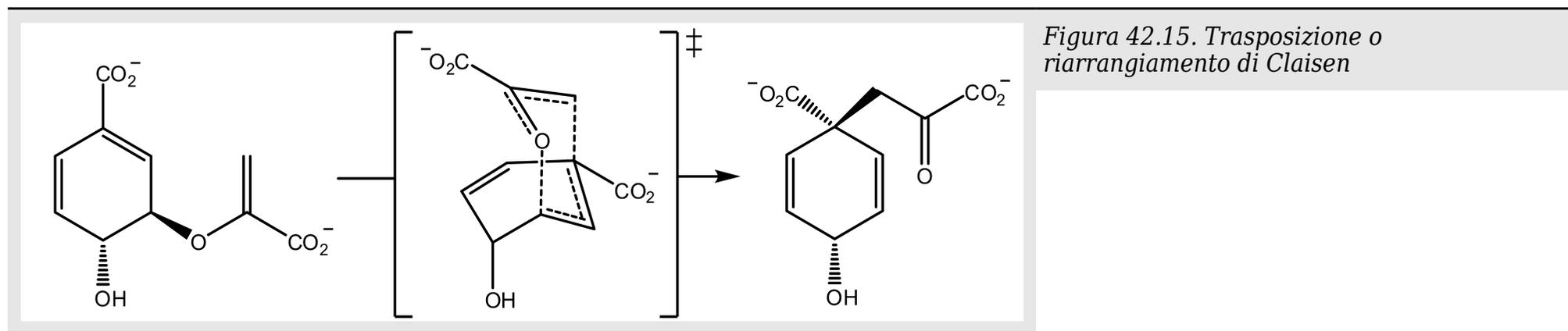
Questo saggio sensibile consente lo screening per l'attività catalitica di anticorpi simili direttamente nella piastra da ELISA

☞ Si può quindi ottenere una eccellente stereo-specificità sia con substrati di piccole che di grandi dimensioni e centri chirali posizionati sia nella porzione alcolica del substrato che in quella del gruppo acilico

Questa strategia può essere applicata alla risoluzione di alcoli ed esteri racemici nella produzione di prodotti farmaceutici

42.4.12. TRASPOSIZIONE O RIARRANGIAMENTO DI CLAISEN

☞ Il riarrangiamento di Claisen del corismato a prefenato coinvolge la rottura coordinata di un legame carbonio-ossigeno e la formazione di un legame carbonio carbonio
L'enzima che catalizza la reazione, corismato mutasi, fa parte della via di biosintesi degli aminoacidi aromatici nelle piante e nei batteri





Il diacido biciclico (R=H) è il più potente inibitore della corismato mutasi (è un analogo dello stato di transizione)

Questo inibitore è stato modificato con due gruppi diversi (R1 ed R2) indipendentemente per ottenere anticorpi catalitici in grado di accelerare la reazione sopra descritta

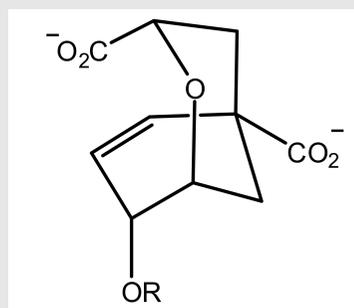
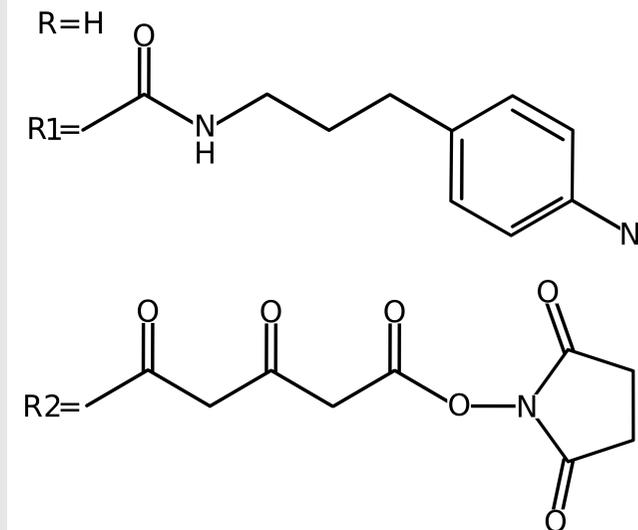


Figura 42.16. Diacido biciclico (in alto)

Figura 42.17. Gruppi laterali per il diacido biciclico (a dx)



- Utilizzando R1 (vedi fig. in alto a dx.) di otto anticorpi specifici uno solo risultò catalitico con una k_{cat} di 2.7 min^{-1} ed una K_M di 260 M che corrisponde ad un aumento di velocità di 10^4 rispetto alla reazione spontanea (10^6 è il fattore di accelerazione dell'enzima corismato mutasi di *E. coli* saggiato nelle medesime condizioni)

- Utilizzando R2 (vedi fig. in alto a dx.) solo 1 anticorpo su 15 specifici aveva una debole attività catalitica, anche se altamente stereo-specifica [90:1 isomero (-)/isomero (+)]



Nel primo caso il blocco del substrato in una conformazione obbligata è il meccanismo attraverso il quale l'anticorpo catalizza la reazione

Nel secondo caso invece il meccanismo sembra una semplice stabilizzazione entalpica

L'enorme capacità di diversità degli anticorpi apparentemente produce catalizzatori che operano con modalità fondamentalmente diverse anche se prodotti verso antigeni essenzialmente identici

42.5. Reazioni per cui non si conoscono enzimi



Questo approccio può essere applicato anche ad altre reazioni di formazione di legami carbonio-carbonio per cui non sono conosciuti catalizzatori enzimatici. Es.:

- la reazione di Diels-Alder
- la reazione di Cope

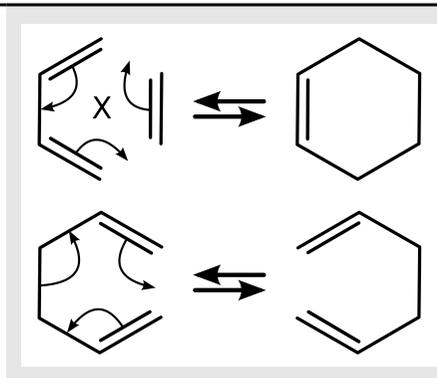


Figura 42.18. Reazione di Diels-Alder (in alto); reazione di Cope (in basso)

42.5.1. FORMAZIONE DI MACROLIDI



Tra le reazioni di cui non si conoscono enzimi figura una importante classe che include la formazione di macrolidi ad anelli a 12-16 atomi e peptidi ciclici

Queste reazioni costituiscono un problema considerevole nella sintesi di antibiotici come la eritromicina e di farmaci immuno-soppressori come FK506

Usando una strategia simile a quella descritta in seguito per reazioni di trasferimento di gruppi acilici, si potrebbero usare anticorpi per ridurre le necessità entropiche per portare i gruppi terminali reattivi di questi precursori lineari nell'orientamento richiesto per la chiusura dell'anello

42.5.2. REAZIONI DI TRASFERIMENTO DI UN GRUPPO ACILICO



Le forzature imposte dalla tasca di legame dell'anticorpo dovrebbero facilitare (cioè accelerare) le reazioni di trasferimento di un gruppo acilico o fosforilico riducendo l'entropia di rotazione e di traslazione dei reattivi

La catalisi del trasferimento intra-molecolare di un gruppo acilico per formare un estere ciclico o lattone (lattonizzazione) è stato il primo esempio dell'uso di questa strategia nel disegno di anticorpi catalitici

Anticorpi furono prodotti contro l'**estere fosfonato ciclico**

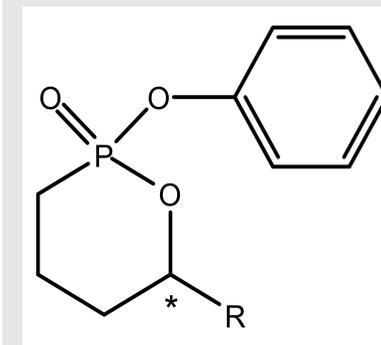


Figura 42.19. Estere fosfonato ciclico (dx.)



Questo aptene è un analogo dello stato di transizione della reazione di ciclizzazione a sei atomi

I parametri cinetici erano $k_{cat}=0.5 \text{ min}^{-1}$ e $K_M=76 \text{ }\mu\text{M}$; l'accelerazione prodotta da questo anticorpo era di 167 volte rispetto alla reazione spontanea

L'anticorpo era stereo-selettivo, producendo il 94 % di un singolo isomero del prodotto quando il substrato era formato da una miscela 50/50 di due isomeri

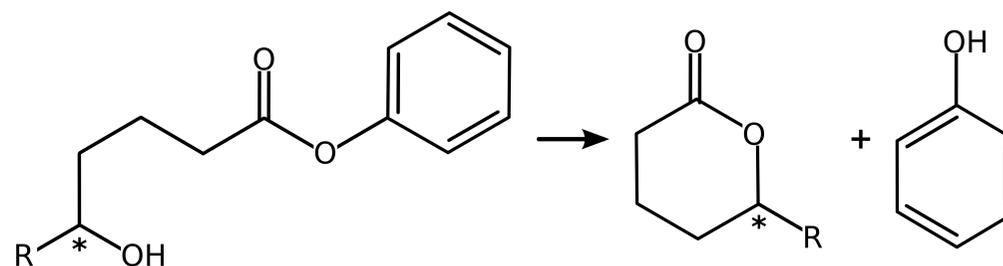


Figura 42.20. Reazione di ciclizzazione a sei atomi

42.6. Reazioni bi-molecolari



Un significativo sviluppo nella preparazione di anticorpi catalitici è stato l'utilizzo dell'energia di legame dell'anticorpo per superare le barriere entropiche delle reazioni bi-molecolari

L'anticorpo che ha catalizzato la reazione:

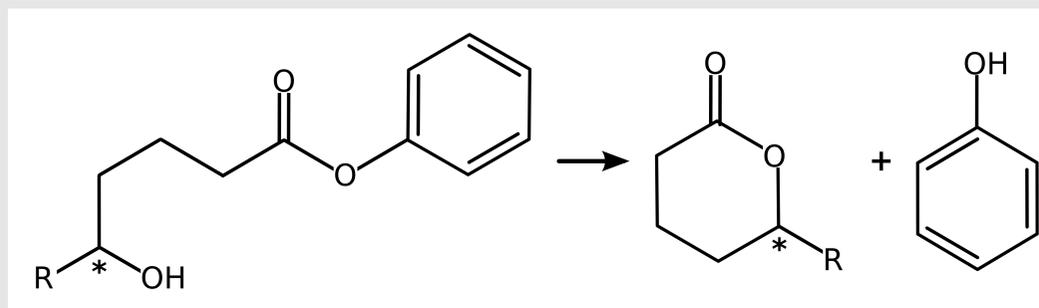


Figura 42.21.
Reazione di rottura

catalizza anche la formazione di un legame ammidico bi-molecolare (a dx)

L'anticorpo lega:

- *p*-fenilendiammina ($K_M=1.2$ mM)
- lattone ($K_M=4.9$ mM)

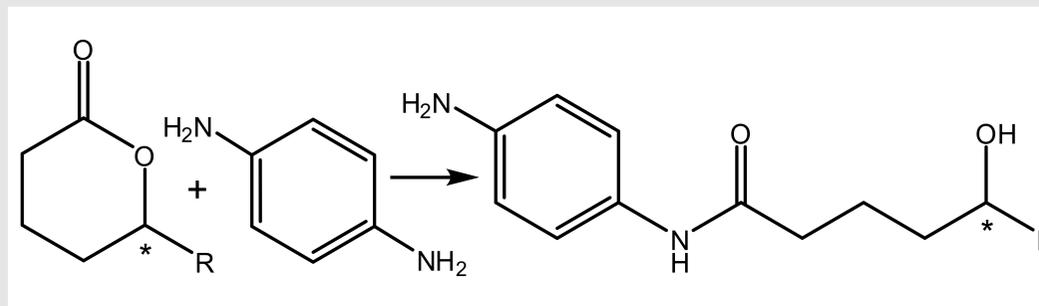


Figura 42.22.
formazione di un legame ammidico bi-molecolare

L'inibitore a fianco riprodotto era competitivo per entrambe le reazioni:

- condensazione bi-molecolare ($K_I=75$ nM)
- ciclizzazione ($K_I=250$ nM)

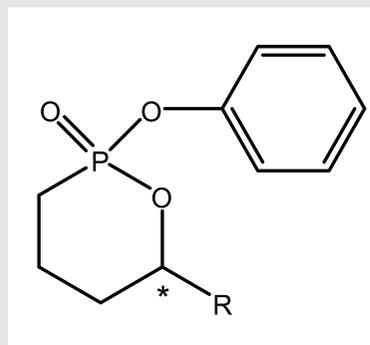


Figura 42.23. Estere fosfonato ciclico usato come aptene nella produzione di anticorpo, che è risultato un inibitore competitivo delle reazioni catalizzate dall'anticorpo stesso, dimostrando che la catalisi avviene nel sito di legame dell'estere fosfonato/inibitore

42.6.1. REAZIONE BI-MOLECOLARE DI FORMAZIONE DI UN LEGAME AMMIDICO



Figura 42.24. Fosfonamidato

Un anticorpo generato contro il fosfonamidato è stato in grado di catalizzare la reazione bi-molecolare di formazione di un legame ammidico

Questo anticorpo forniva una molarità effettiva di 10.5 M

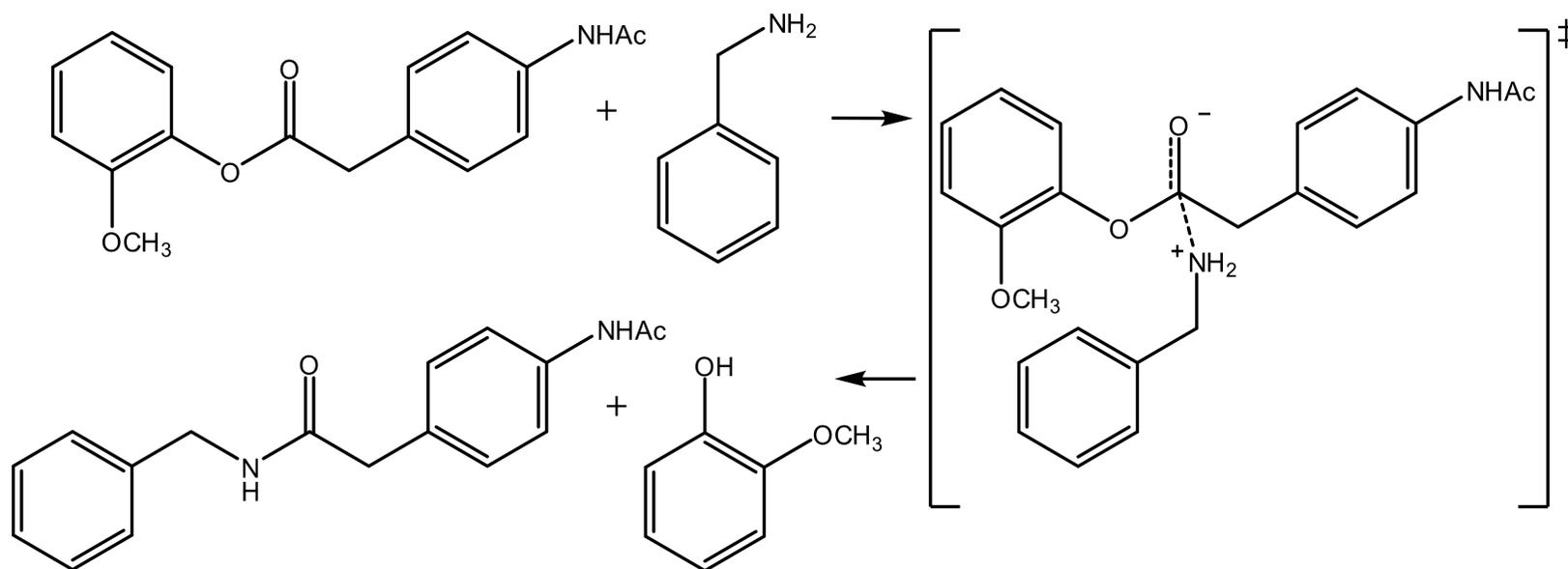
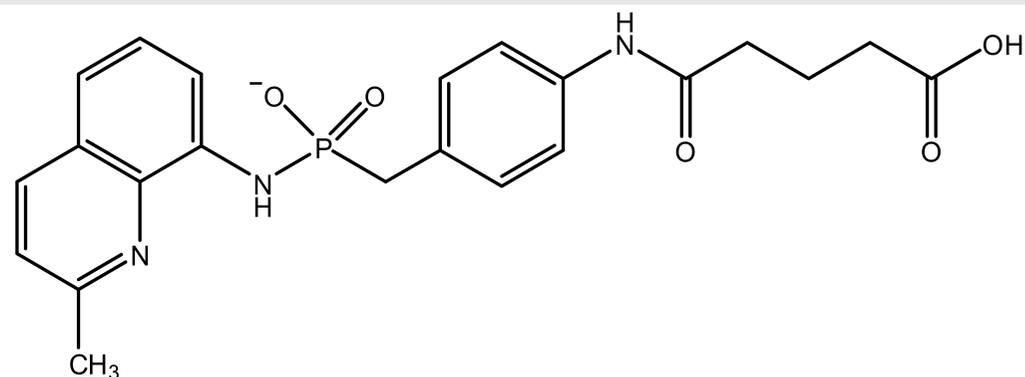


Figura 42.25. Reazione bi-molecolare di formazione di un legame ammidico

Condensazione di peptidi

 La condensazione di grandi frammenti peptidici provenienti da un sintetizzatore è lenta in soluzione e soggetta a molte reazioni collaterali non desiderate.

Perciò la reazione di ligasi di frammenti peptidici (> 50 amminoacidi) rappresenta un ostacolo alla sintesi *de novo* di grandi proteine

Gli anticorpi usando le strategie descritte possono essere disegnati per avvicinare gli appropriati gruppi terminali carbossilico ed amminico (gruppi di protezione non sarebbero necessari) nel sito combinatorio e per catalizzare la reazione di formazione del legame peptidico

Condensazione aldolica

 Un'altra classe di reazioni bi-molecolari che può essere catalizzata con questa strategia è la condensazione aldolica

- un esempio di questa classe di reazioni è la formazione di fruttosio 1,6 difosfato da diidrossiacetone-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato che è catalizzata dall'enzima aconitasi

Transamminazione

 Recentemente anticorpi prodotti contro una base di Schiff formata tra *p*-nitro-fenilalanina e piridossale hanno catalizzato una reazione di transamminazione tra piridossamina ed il corrispondente α -chetoacido

42.7. Utilizzo di cofattori

Molti enzimi utilizzano cofattori non amminoacidici per catalizzare reazioni. Importanti membri di questa classe di enzimi includono:

- citocromo P450 (Fe-eme)
- α -chetoacido deidrogenasi (tiamina pirofosfato)
- D-amminoacido ossidasi (flavina)
- alanina racemasi (piridossal fosfato)

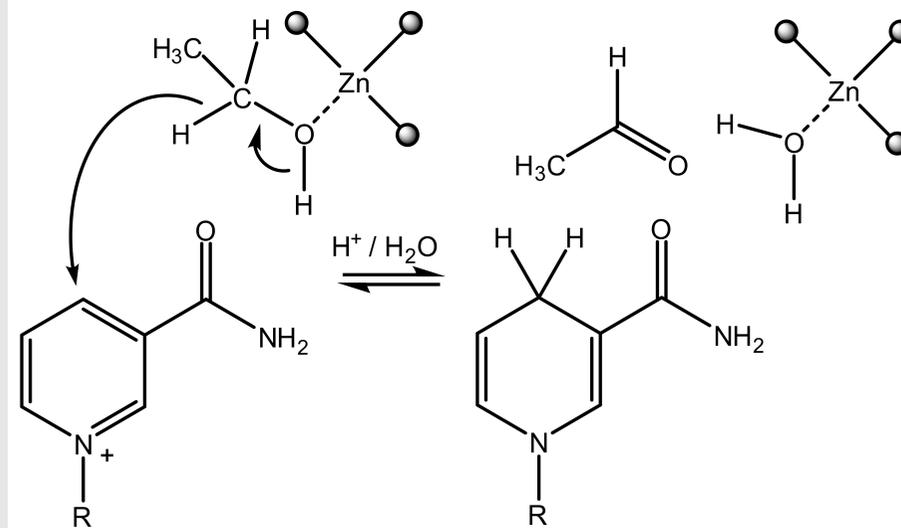


Figura 42.26. Esempio enzimatico: l'enzima alcol deidrogenasi usa un complesso dello zinco bivalente Zn(II) per polarizzare l'ossigeno alcolico allo scopo di facilitare il trasferimento dell'idruro dall'alcool ad un secondo cofattore, NAD⁺, che agisce come un accettore di elettroni



Per estendere la catalisi mediata da anticorpi a reazioni con alte richieste energetiche, si devono usare strategie che permettano l'incorporazione di cofattori nei siti di legame



Per estendere la catalisi mediata da anticorpi le reazioni di ossido-riduzione e le reazioni idrolitiche con alte richieste energetiche, possono essere catalizzate da cofattori flavinici

A questo scopo sono stati indotti anticorpi contro il cofattore flavinico

Gli anticorpi ottenuti contro la forma ossidata legano questa forma con una affinità 4×10^4 più alta rispetto alla forma ridotta

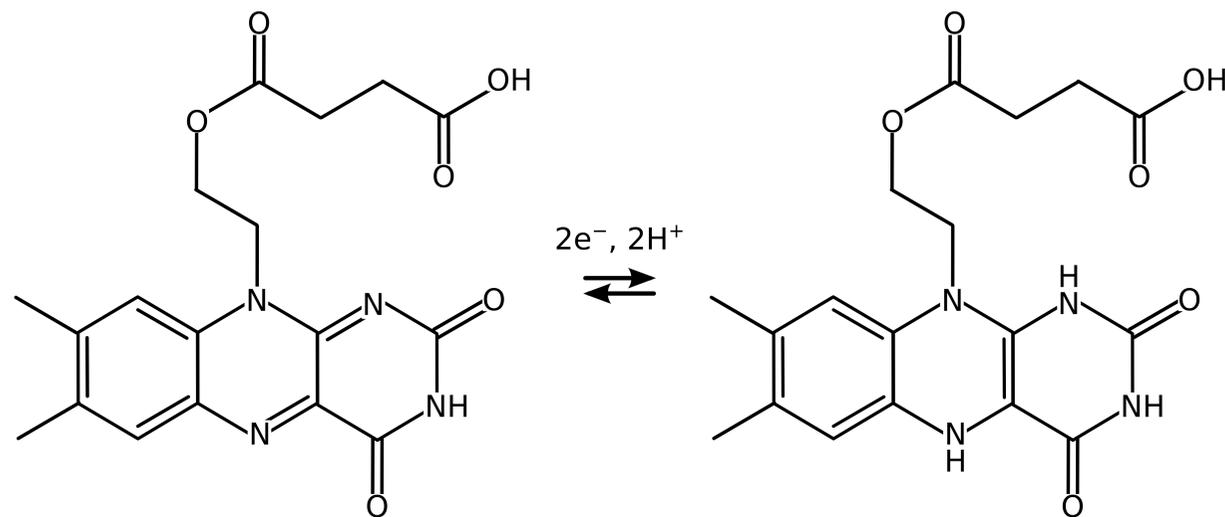


Figura 42.27. I tre anelli sono complanari nella forma ossidata di flavina (a sinistra)

La forma ridotta (a destra) ha una distribuzione di elettroni sostanzialmente differente ed ha anche una diversa conformazione. La forma ridotta, infatti, ha una forma a farfalla a causa della ibridazione sp^3 (a geometria tetraedrica) dei due atomi di azoto nell'anello centrale

 Incorporando siti di legame per il substrato adiacenti alla flavina, si possono quindi fare riduzioni chimiche stereo-controllate

42.7.1. IDROLISI DEL LEGAME PEPTIDICO

☞ Sono stati generati anticorpi verso un complesso peptide-cofattore capaci di catalizzare l'idrolisi di un legame peptidico Gly-Phe

Benché sia stato usato come cofattore nella struttura immunogena un complesso trienico di Co (III) inerte, i 14 anticorpi ottenuti erano in grado di legare tutti e 13 i diversi complessi trienici provati

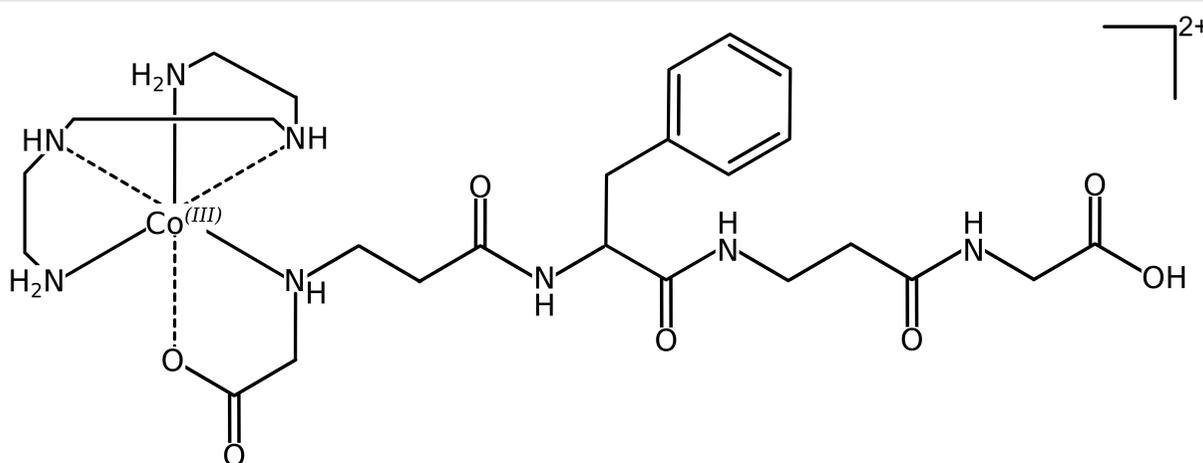


Figura 42.28. Complesso trienico di Co (III) inerte

☞ In presenza di una varietà di complessi metallici trienici due di questi anticorpi catalizzarono la rottura del legame peptidico Gly-Phe con un numero di *turnover* di $6 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$

Sorprendentemente il legame Gly-Phe idrolizzato è quello a fianco del legame maggiormente indicato come legame idrolizzabile secondo analisi chimica e strutturale

☞ Un esempio molto particolare di anticorpo catalitico in grado di rompere un legame peptidico è il caso di due auto-anticorpi umani IgG in VIP (*vasoactive intestinal peptide*) tra i residui Gln16 e Met17

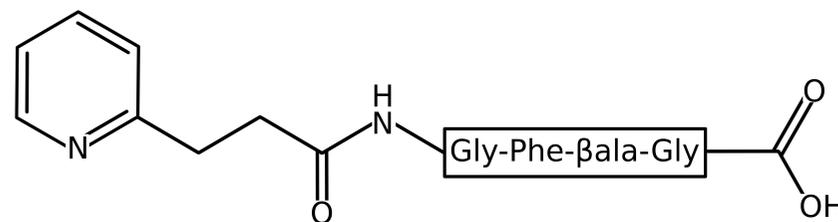


Figura 42.29. Peptide

42.8. Principali fonti utilizzate

Blackburn, G.M., Kang, A.S., Burton, D. (1989) Catalytic antibodies. *Biochem. J.* 262, 381-390

Benkovic, S.J., Napper, A.D., Lerner, R.A. (1988) Catalysis of a stereospecific bimolecular amide synthesis by an antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5355-5358

Deng, S.X., de Prada, P., Landry, D.W. (2002) Anticocaine catalytic antibodies. *J Immunol.. Methods* 269, 299-310

Hanson, C.V., Nishiyama, Y., Paul, S. (2005) Catalytic antibodies and their applications. *Curr. Op. Biotech.* 16, 631-636

Hilvert, D., Nared, K.D. (1988) Stereospecific Claisen rearrangement catalyzed by an antibody. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5593-5594

Lacroix-Desmazes, S., Wootla, B., Delignat, S., Dasgupta, S., Nagaraja, V., Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V. (2006) Pathophysiology of catalytic antibodies. *Immunol. Lett.* 103, 3-7

Nevinsky, G.A (2011) Natural catalytic antibodies in norm, autoimmune and viral diseases. *Recent Res. in Mod. Med.* 321-323 at www.wseas.us ISBN: 978-960-474-278-3

Nevinsky, G.A., Buneva, V.N. (2003) Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 7, 265-276

Paul, S., Nishiyama, Y., Planque, S., Karle, S., Taguchi, H., Hanson, C., Weksler, M.E. (2005) Antibodies as defensive enzymes. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 485-503

Stewart, J.D., Liotta, L.J., Benkovic, S.J. (1993) Reaction mechanisms displayed by catalytic antibodies. *Acc. Chem. Res.* 26, 396-404

Wentworth, P.Jr., Jandat, K.D. (1998) Catalytic antibodies. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2, 138-144

Siti web

wseas.us/e-library

visitato il 28/09/2011

accessibile il 02/07/2012

chemistry.msu.edu/C_Frawley

visitato il 28/09/2011

accessibile il 02/07/2012

