

## 촉매항체의 개발

김 세 권

부산수산대학교 자연과학대학 화학과

### Developments of Catalytic Antibody

Se-Kwon KIM

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan,  
Pusan 608-737, Korea

#### 1. 서 론

우리가 원하는 화학반응을 특이적으로 촉매하는 효과적인 촉매분자를 공학적인 수법으로 자유자재로 만들어 낸다고 하는 것은 공학에 접근하기 힘든 화학자의 오랜 세월의 꿈이 아닐까? 오늘날까지 여러분야의 연구자들은 새로운 촉매개발을 위해 다종다양한 방법론에 기초를 두고 많은 노력을 기울여 왔다. 효소와 같은 물질이 갖는 특이성과 촉매기능을 설계하는데 있어서 가장 중요한 것은 높은 특이성을 갖는 수용체분자(항체 또는 효소)의 “인식의 장”을 구축하는 데 있다. 이같은 생각에서 crown ether와 cyclodextrin과 같이 포접부위를 갖는 화합물을 합성시켜 이에 기능성 부여가 유기화학적 접근으로 행해지고 있다.<sup>1)</sup> 또한 근년 분자생물학적 기법의 발전은 기존 효소의 특이성 변환을 가능하게 하고 있다.<sup>2,3)</sup>

그런데 생체에는 효소와 같은 촉매작용은 없지만 특정 기질을 인식하여 그것과 강하게 결합하는 단백질이 이미 갖춰져 있다. 이것이 바로 면역응답에 의해 생기는 항체이다. 면역현상은 핵산, 단백질, 당 등의 생체고분자와 스테로이드, 프로스타글란딘 등의 비교적 작은 분자에 대해서도 특이적으로 결합하는 항체를 만들어 항원과 반응하는 것이다. 즉 면역현상을 이용함으로써 거의 모든 물질(화합물)에 대하여 항체라고 하는 “인식의 장”을 쉽게 얻을 수 있게 되었다. 더구나 최근 모노클로날 항체(monoclonal antibody)에 관한 기술로 인하여 높은 친화성과 특이성을 갖는 단일 단백질인 항체를 만들 수 있게 되었다.<sup>4)</sup> 따라서

다음 과제는 어떻게 하여 이 항체분자에 촉매작용을 나타내게 하는 “화학반응의 장”으로 만드는 가에 있다. 새로운 촉매항체(catalytic antibody)의 개념은 화학과 생물학간의 이론과 기술의 경계영역으로 이루어져 왔다.<sup>5)</sup>

촉매항체는 Lerner(Scripps 의학연구소)와 Schultz(California 대학, Berkeley) 등 두 연구팀에 의해 1986년에 최초로 보고되었다.<sup>6, 7)</sup> 이들은 반응의 전이상태에서 에스테르결합을 가수분해하는 촉매항체를 만들어 냈다. 그 후, 활발한 연구진전에 의해 오늘날에는 항체가 촉매하는 반응의 종류도 보다 복잡화되었다. 지금까지 2분자 반응,<sup>8)</sup> 환상전자 반응(pericyclic reaction),<sup>9-11)</sup> 광환원 반응,<sup>12)</sup> 산화환원 반응,<sup>13, 14)</sup> 탈보호기 반응,<sup>15)</sup> 탈리 반응,<sup>16)</sup> 아미드(펩티드결합)의 가수분해 반응<sup>17)</sup> 등이 보고되어 있다. 또 반응속도를 10<sup>6</sup>배 이상이나 가속시키는 항체<sup>18)</sup>나 광학이성체를 완전히 식별하여 반응을 촉매하는 항체<sup>19, 20)</sup>도 보고되어 있고, 또한 촉매활성이나 기질 특이성도 함께 향상시켜 왔다. 촉매항체의 연구는 당장 유기화학, 면역학은 물론이고, 효소화학, 생화학, 단백질화학, 분자생물학 등 관련분야의 연구자들에게 대단한 관심을 불러 일으키고 있다.

본고에서는 항체의 구조와 기능, 촉매항체의 이론적 배경과 방법론에 대하여, 특히 에스테르-아미드결합의 가수분해반응을 중심으로 기술하고자 한다.

#### 2. 항체의 구조와 기능<sup>21)</sup>

##### 1) 항체의 기본구조

항체(IgG)단백질은 분자량이 약 150kDa이며, 2가닥의 L사슬(light chain)과 2가닥의 H사슬(heavy chain)로 구성되어 있다. 각각의 사슬은 2개의 S-S결합과 비공유 결합으로 이루어져 있으며, 전체적으로 Y자형 구조를 형성하고 있다(Fig. 1). L사슬은 215개 전후의 아미노산으로 만들어진 짧은 펩티드사슬이며, H사슬은 430개 전후의 아미노산으로 만들어진 긴 펩티드사슬이다. L사슬은 H사슬과 함께 아미노산 배열이 유사한 상동단위(약 110개의 아미노산)가 반복하여 구성되어 있고, 상동단위는 S-S결합에 의해 구상의 domain구조를 형성하고 있다. L사슬은 2개의 domain, H사슬은 4~5개의 domain으로 구성되어 있다.

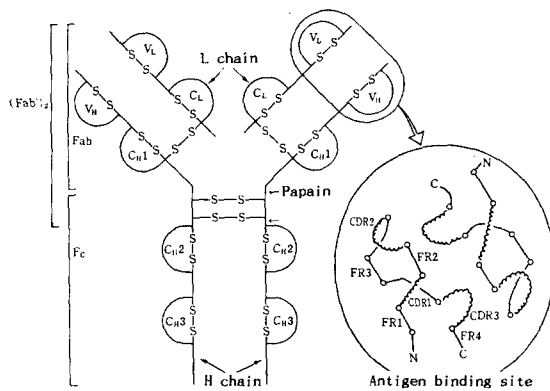


Fig. 1. The schematic structure of immunoglobulins (antibodies).

L사슬과 H사슬의 N말단측의 최초의 domain으로서 항원과 결합하는 부위를 가변영역(variable region)이라 하며, 그 아미노산 배열은 항원에의 결합특이성에 따라 다르다. 또 가변영역 이외의 부분은 정상영역(constant region)이라 부르며, 아미노산 배열은 동일한 조(class)에서는 항체의 결합특이성과는 관계없이 일정한 배열을 하고 있다. 항체는 H사슬의 정상영역의 아미노산 배열에 기초를 두어, 5개조(IgM, IgD, IgG, IgE 및 IgA)로 대별된다. 항체는 papain 처리에 의해 hinge부에서 절단되어 2개의 동일한 Fab와 1개의 Fc로 분해된다. 또 pepsin처리에서는 정상영역이 분해되어 F(ab')<sub>2</sub>로 된다.

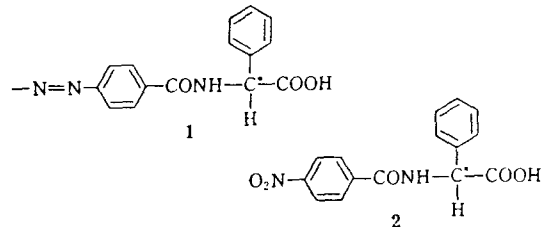
가변영역은 아미노산 배열이 일정한 4개의 골격영역

(framework residues ; FR)인 FR-1, FR-2, FR-3, FR-4와 아미노산 배열의 변화가 많은 3개의 초가변영역(hypervariable region 또는 complementarity determining region ; CDR)인 CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub>, CDR<sub>3</sub>로 나누어 진다.<sup>22)</sup> L사슬과 H사슬은 각각 3개의 CDR, 합계 6가닥의 펩티드부분(segment)이 모여 항원 결합부위를 형성한다. 항원 결합부위의 크기는 사용한 항원에 의존하지만 거의 700~800Å<sup>2</sup>으로 추정된다.<sup>23, 24)</sup>

## 2) 항체의 다양성과 항원결합 특이성

면역계를 착안한 큰 이유는 항체의 다양성과 높은 친화성을 갖는 항원결합 특이성에 있다고 볼 수 있다. 면역작용에 의하면 거의 모든 항원에 대하여 높은 친화성과 특이성을 갖는 항체가 만들어 진다. 이들의 다양성이 어떻게 하여 발현되는가에 대해서는 최근 유전자 공학의 급속한 진보에 의해 해명되고 있다. 항체의 다양성은 생식세포 → B세포 → 항체 생산세포로 분화되는 과정에서 일어나 항체를 암호화하는 유전자를 조합시킴으로써 발현된다. 항체 생산세포로 분화된 세포는 하나의 항원결정기만을 인식하여 균일한 항체만을 생산한다. 사람이나 쥐의 체내에는 각각 다른 항원결정기를 인식하는 B세포 클론이 약 10<sup>8</sup>~12<sup>10</sup>개 존재하는 것으로 추정되고 있다.<sup>25)</sup>

항체는 항원에 대하여 강한 친화성을 가지며 전형적인 회합정수(K<sub>a</sub>)는 10<sup>5</sup>~10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>이다. 지금까지 보고된 것 중에서 친화성이 가장 높은 것으로는 K<sub>a</sub>가 10<sup>12</sup>M<sup>-1</sup>인 것도 있다.<sup>26)</sup> 항체는 기질의 일시적인 구조변화에도 확실히 대응하는 높은 항원결합 특이성을 가지며, 구조이성체(2중결합 cis vs trans),<sup>27)</sup> 치환기의 크기(메틸기 vs 에틸기),<sup>28)</sup> 관능기의 차이(수산기 vs 카르보닐기, 2중결합 vs 단일결합)<sup>29)</sup>를 확실히 인식한다. 예를 들면 hapten(1)의 D형에서 면역된 항체는 기질(2)의 D형이 L형에 비해 200배 강한 친화성을 갖고 결합한다.<sup>30)</sup>



### 3) 촉매항체(모노클로날 항체)의 조제

모노클로날 항체는 한개의 B세포 또는 한개의 세포에서 세포분열에 의해 생긴 균일한 세포집단(monoclonal)에 의해 생산되는 항체이다. 따라서 항원분자의 특정 항원결정기만을 인식하여 일정한 친화성과 특이성을 갖는다. 일반적으로 한개의 항원분자상에는 2종류 이상의 특이적인 항원결정기가 있는 것이 많고, 한개의 항원과 반응하는 클론은 1종류만이 아니다. 어떤 항원에서 면역되어 얻어진 항체는 많은 클론 유래의 항체혼합(다클론성 항체, polyclonal antibody)이라 생각된다. 따라서 촉매항체의 연구에 있어서 hapten설계의 타당성과 촉매활성의 평가에는 모노클로날 항체의 제작이 필요하다. 실제 모노클로날 항체의 제작법에 대해서는 많은 연구보고가 있다.<sup>31)</sup>

일반적으로 hapten은 비교적 저분자량의 화합물로서 항체와 결합하지만 면역원성은 가지지 않는다. 따라서 면역응답을 일으키기 위해서는 hapten을 linker로 담체 단백질(carrier protein)과 결합시켜야 한다. 담체 단백질로서는 BSA(bovine serum albumin; 분자량 67kDa)나 KLH(keyhole limpet hemocyanin; 분자량  $4.5 \times 10^2 \sim 1.3 \times 10^4$  kDa)이 범용되고 있다. 또 효과적인 면역응답을 위해서는 담체 단백질 1분자당 6~30분자의 hapten이 적당하다.<sup>31)</sup> KLH는 화학수식이 가능한 다수의 lysine 잔기를 가지고 있고, BSA의 경우는 59개의 lysine 잔기 중 30~35개가 hapten과의 결합에 이용된다.

Hapten분자와 담체 단백질과의 거리(linker분자의 길이)는 항원 결합부위와 담체 단백질과의 입체반발을 피하기 위해 약 6~8Å이 좋다고 한다.<sup>33)</sup> 또 hapten분자의 어느 부분에서 담체 단백질과 어떻게 결합되는가 하는 문제도 자주 그 촉매활성에 영향을 주기 때문에 충분히 검토되지 않으면 안된다. 일반적으로 면역에는 hapten-KLH 복합체가 사용되며, 항체의 검색시험(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)법에 hapten-BSA 복합체가 사용되는데, 그 이유는 검색단계에서 KLH 자신에 대한 항체를 제외하기 때문이다.

항체의 순도는 상당히 중요하며, 특히 기대되는 반응이 효소에 의해 촉매되는 경우에는 세심한 주의가 필요하다. 복수(腹水)에서 얻어진 항체(IgG의 경우)는 최종적으로 affinity chromatography(protein G) 및 ion-exchange chromatography(mono Q)로 정제된다. 예를 들면 촉매항체의 생명과학

활성( $k_{cat}$ )이  $1.0 \text{ min}^{-1}$ 이고, 혼재(混在)하는 효소의 활성( $k_{cat}$ )이  $3 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ 인 경우에는 천연효소가 0.00006% (mol/mol) 정도 혼재하여도 항체에 촉매활성이 있는 것으로 오인해 버리게 되는 경우도 있다.<sup>34)</sup> 물론 이 정도의 효소량은 겔전기영동(SDS-PAGE)에서 검출될 수 없다. 또 여러가지 동력학적 변수(kinetic parameter;  $K_m$ ,  $k_{cat}$ )와 기질특이성도 활성분체가 항체인가 혼재효소인가 하는 판정기준으로 될 수 없다. 보통 적어도 촉매활성은 면역에 사용한 hapten분자에 의해 완전히 저해되어야 한다(저해되었다고 해서 촉매항체라고 단정지을 수 없다).

촉매항체의 연구보고 가운데 저해실험 결과를 반드시 명시해 주는 이유는 다음과 같다. 여러가지 동력학적 변수와 저해실험의 결과를 종합적으로 판단해야 하며, 효소의 혼재가 염려되는 경우에는 2~3번 정제를 반복하거나 또는 항체를 protease로 분해하여 Fab로서 단리할 필요가 있다. 실제 Fujii<sup>35)</sup>는 천연효소의 혼재가 자주 문제가 되어 hapten에 의한 저해실험 결과를 제 1의 판단기준으로 하고 있다고 한다.

### 3. 촉매항체

항체에 촉매작용을 어떻게 도입할 것인가? 오늘날 여러 입장에서 여러가지 방법으로 촉매항체의 연구가 행해지고 있지만 대표적인 방법으로는 다음에 나타난 두가지의 접근방법을 들 수 있다. 첫째는 hapten에 대한 항체의 입체적 또는 전자적 상보성을 이용하는 것으로, ① 반응의 전이 상태를 인식하는 결합부위를 구축하는 것(전이상태의 안정화). ② 결합부위에 촉매활성을 갖는 아미노산 잔기를 유기(誘起)시키는 방법(Bait-and-Switch법). ③ 금속이나 보조소 등의 촉매활성에 대한 결합부위(cofactor-결합부위)를 구축하는 방법이다. 둘째는 기질 특이적인 항체(촉매활성은 없다)를 직접 화학수식 하든가<sup>36)</sup> 또는 부위 특이적 변이유발 등의 방법으로 촉매활성을 도입하는 방법이다.<sup>37)</sup> 여기서는 주로 항체-hapten 상보성을 이용한 첫째 방법에 대하여 기술하고자 한다.

#### 1) 전이상태의 안정화

어떤 종류의 효소에 있어서 그 촉매활성의 크기는 엔트로피 인자, 산·염기 촉매, 정전기적 효과 등에 의해 설명될

수 있다. 이들의 촉매인자에 대하여 효소의 두드러진 특징의 하나는 효소가 반응의 전이상태와 강하게 결합함으로써 그것을 안정화시켜 반응의 활성화 자유에너지( $\Delta G^\ddagger$ )를 감소시킨다는 것이다.<sup>38)</sup>

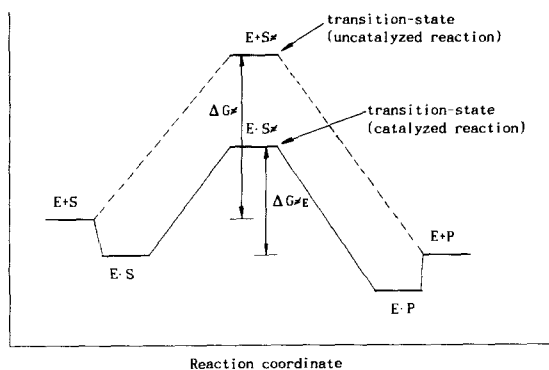


Fig. 2. Energy profile of a chemical reaction : Uncatalyzed reaction (-----), catalyzed reaction (—————).

기질 S분자를 생성물 P분자로 변환시키는 데는 전이상태 S<sup>‡</sup>(Fig. 2, -----선)를 통과하기 위해서는 자유에너지 장벽을 뛰어 넘어야 된다. 전이상태 이론에서 S→P 반응 속도는 단위시간 당 전이상태로 들어 가는 S분자 수에 의존한다. 반응속도를 구하는 데는 전이상태와 기저상태가 열역학적으로 평형에 있다고 가정하여 전이상태의 농도에 그 붕괴속도 정수를 곱하여 구할 수 있다.

반응속도를 증가시키는 데는 두가지 방법이 있다. 하나는 온도를 상승시키는 것이며, 또 하나는 촉매를 사용하여 활성화 자유에너지를 감소시키는 것이다(Fig. 2, ———). 효소가 존재하면 반응의 전이상태는 안정화되고, 반응분자가 상당히 높은 비율로 존재하여 증가하게 된다.

촉매항체의 촉매작용도 효소와 마찬가지로 반응의 전이상태를 안정화한다는 것에 근거를 두고 있다. 즉 항체의 다양성과 기질특이성을 이용하여 전이상태의 항체분자에 꼭 들어 맞는 모양과 이에 맞는 항원 결합부위를 구축하는 것이다. 물론 실제 전이상태와 아주 똑같은 분자종을 얻는 것은 불가능하다. 따라서 전이상태와 입체적 그리고 전자

적으로 더욱 비슷한 분자(전이상태 analogue)를 면역가능한 안정한 화합물로 설계하여 합성할 필요가 있다.<sup>39, 40)</sup> 그리고 그 전이상태와의 유사성은 촉매항체의 활성화와 밀접한 관계가 있다. 또 대부분의 경우, 하나의 반응에 있어서 몇가지의 전이상태가 존재하기 때문에 어느 단계가 반응의 속도제한 단계(rate-limiting step)인가를 충분히 고려하여 설계해야 한다.

### ① 에스테르 결합의 가수분해 반응

이상과 같은 점을 고려하여 설계된 haptin이 1983년 Lerner 등에 의해 처음으로 보고되었다.<sup>41)</sup> 에스테르 결합의 가수분해 반응은 Fig. 3에 나타난 카르보닐기의 산소원자 상에 음전하를 갖는 고에너지-4면체 중간체(A)<sup>42)</sup>를 경유하여 진행된다. 이 4면체 중간체(A)에 입체적 또는 전자

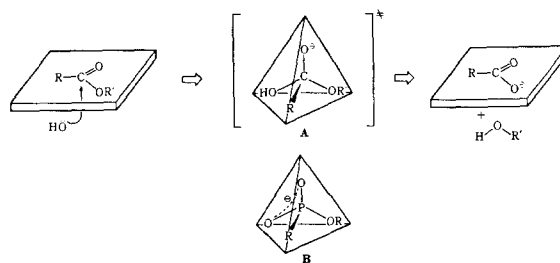
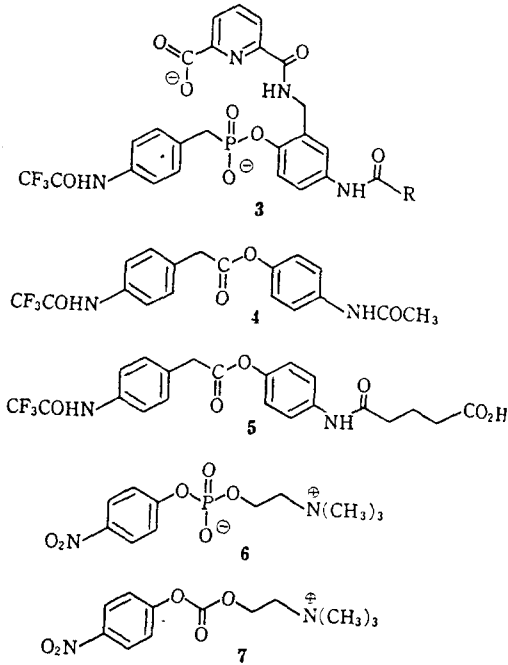


Fig. 3. Transition state analogue and hydrolysis reaction of ester bond.

적으로 상보적인 항체의 항원 결합부위는 반응의 활성화 자유에너지를 감소시킨다. 또한 카르보닐기의 분극을 돕고 친핵체인 수산기의 공격을 쉽게 한다고 생각된다. 이들은 인산에스테르(B)를 전이상태 analogue라 생각하여 이것을 haptin으로 면역시킴으로써 에스테르의 가수분해를 촉매하는 항체의 제작에 성공하였다. 4면체 구조를 형성하는 인산에스테르는 중심의 인원자가 양전하, 산소원자가 음전하를 가져 에스테르(A)의 카르보닐기가 분극된 상태와 아주 유사하다. 또 P-O결합의 길이는 C-O결합에 비해 약 20% 정도 길고 알맞는 결합이 형성되어지는 실제 전이상태의 C-O결합의 길이와 유사하다. 이들은 인산에스테르(3)를 haptin으로 사용하여 얻어진 항체가 에스테르(4, 5)의 가수분해반응을 촉매하는 것으로 나타났다(4 :

$K_m=1.9\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=1.62\text{ min}^{-1}$ ; 5:  $K_m=0.62\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=0.8\text{ min}^{-1}$ ). 각 기질(4, 5)의 가수분해 반응속도는 무촉매에 비해 각각 960배와 210배가 증가되었다. 또 이 촉매반응은 면역에 사용된 haptten에 의해 저해를 받는 것으로 밝혀졌다 (4:  $K_i=0.16\mu\text{M}$ ; 5:  $K_i=0.065\mu\text{M}$ )



또 MOPC 167이라 불리는 골수종 세포(myeloma cell)가 생산하는 항체에서도 가수분해 반응을 촉매하는 활성이 있는 것으로 발견되었다. 이 항체가 *p*-nitrophenylphosphorylcholine(6)과 특이적으로 결합한다는 것은 이전부터 알려져 있지만, Schultz 등<sup>7)</sup>은 (6)의 인산에스테르 부분이 탄산에스테르 가수분해반응의 전이상태 analogue에 해당된다고 하는 것에 착안하였다. 이 항체를 사용하여 기질(7)의 가수분해반응을 검토한 결과 약 770배의 반응속도의 가속이 관측되었다( $K_m=208\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=0.4\text{ min}^{-1}$ ).

그런데 이같은 전이상태의 안정화에 기초를 두고 설계된 촉매항체에는 어느 정도의 활성이 기대될 수 있는 것인가? 이것은 전이상태 이론으로부터 반응속도의 가속을 쉽게 예상할 수 있다.<sup>43, 44)</sup> Fig. 4에 항체 촉매반응과 무촉매반응의 모식도를 나타내었다.

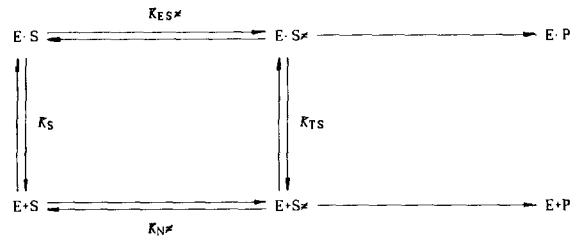


Fig. 4. A thermodynamic cycle interrelating substrate and transition state binding with the catalyzed and uncatalyzed.

여기서  $K_S$ 는 항체-기질복합체의 해리정수,  $K_{TS}$ 는 항체-전이상태복합체의 해리정수이다.

$$K_S = \frac{[E][S]}{[E \cdot S]}, \quad K_{TS} = \frac{[E][S^\ddagger]}{[E \cdot S^\ddagger]}$$

$K_{E \cdot S^\ddagger}$ 는 항체-기질 복합체와 항체-전이상태 복합체의 평형정수,  $K_N^\ddagger$ 는 무촉매하에서의 기질과 전이상태의 평형정수이다.

$$K_{E \cdot S^\ddagger} = \frac{[E \cdot S^\ddagger]}{[E \cdot S]}, \quad K_N^\ddagger = \frac{[S^\ddagger]}{[S]}$$

이 계내는 평형상태이기 때문에

$$(K_{E \cdot S^\ddagger}) \times (K_{TS}) = (K_S) \times (K_N^\ddagger) \dots \dots \dots (1)$$

$$\frac{K_S}{K_{TS}} = \frac{K_{E \cdot S^\ddagger}}{K_N^\ddagger} \dots \dots \dots (2)$$

로 된다. 여기서  $K_{E \cdot S}$ 와  $K_N$ 을 각각 촉매반응과 무촉매반응의 1차 반응속도 정수라 한다. 전이상태 이론의 무촉매반응에 있어서 생성물[P]의 생성속도는 전이상태( $E \cdot S^\ddagger$ )의 농도에 비례한다.

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{kT}{h} [E \cdot S^\ddagger]$$

여기서  $k$ 는 Boltzmann 정수,  $T$ 는 온도(K),  $h$ 는 Plank 정수,  $\frac{kT}{h}$ 는 전이상태의 붕괴빈도이다.

$$[E \cdot S^\ddagger] = K_{ES^\ddagger} \times [E \cdot S]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{kT \cdot K_{E \cdot S}^{\ddagger}}{h} \cdot [E \cdot S] = k_{E \cdot S} [E \cdot S]$$

즉  $k_{E \cdot S}$ 는  $K_{E \cdot S}^{\ddagger}$ 에 비례한다. 마찬가지로 무촉매 반응의 경우도  $k_N$ 은  $K_N^{\ddagger}$ 에 비례한다. 따라서  $k_{E \cdot S}/k_N$ 의 비를 식 (2)에 대입시켜 식 (3)을 유도할 수 있다.

$$\frac{K_S}{K_{TS}} = \frac{K_{E \cdot S}^{\ddagger}}{K_N^{\ddagger}} = \frac{k_{E \cdot S}}{k_N} \dots\dots\dots (3)$$

만약 저해제가 실제의 전이상태와 같은 분자구조를 갖는 것이면 저해상수( $K_i$ )는  $K_{TS}$ 와 같게 될 것이다. 또 단순한 Michaelis-Menten식에 따르면  $K_m \simeq K_S$ 이며, 식 (4)에 나타난 바와 같이  $k_m/k_i$ 와 반응속도의 가속은 일치한다.

$$\frac{K_m}{K_i} = \frac{K_S}{K_{TS}} = \frac{k_{cat}}{k_{uncat}} \dots\dots\dots (4)$$

Table 1에 지금까지 보고된 인산에스테르를 hapten으로 제작한 촉매항체의 kinetic parameters를 나타내었다.<sup>45)</sup> 몇가지 예외를 제외하면 반응속도는  $K_m/K_i$ 값에 비해 10~100배 정도 빨랐다.

이들 결과로부터 촉매 항체의 항원 결합부위는 전이상태를 안정화시키는 기능을 가지고 있는 것으로 추정된다. 저해상수( $K_i$ )는 촉매활성의 평가에는 직접 관여하지 않는 값이지만 촉매항체의 연구(특히 hapten 설계의 평가)에서는 불가결하다는 것이 쉽게 이해될 수 있다. 또 이상과 같은 속도론의 고찰에서 전이상태의 안정화에 의한 반응가속의 상한을 예상할 수 있다. 지금까지 보고되어 있는 것중에서 가장 빈번하게 항원에 결합하는 항체의 해리정수는  $10^{-12}$  M이다<sup>26, 27)</sup>. 따라서 만일 촉매항체의  $K_m$ 값을  $10^{-3}$ M로 한 경우  $K_m/K_i$ 값보다 최고  $10^9$ 배의 반응가속이 관측된다. 즉, 이론적으로는 전이상태의 안정화 면에서, 항체는 효소(효

Table 1. Kinetics parameters for all reported antiphosphonate catalytic antibodies. Multiple entries for a particular reference present kinetic parameters for different antibodies raised against the same hapten, or kinetics parameters for the same antibody assayed against another substrate

$k_{cat}(\text{min}^{-1})$	$K(\mu\text{M})$	$K_i(\mu\text{M})$	$K_m/K_i$	$k_{cat}/k_{uncat}$	reference
1.62	1.9	0.160	1199	960	6
0.48	0.620	0.065	9.54	216	
0.4	208.0	5.0	42.0	770	7
0.32	210	55.0	3.8	624	54
1200	1,500	0.050	30,000	$6.25 \times 10^6$	55
120	150	0.050	3,000	$1.2 \times 10^5$	
4.6	4,000	2	2,000	80,000	19
0.09	394	0.19	2.073	1.619	
0.0023	4.4	0.5	8.8	33	20
0.007	6	0.8	7.5	100	
0.0058	4.5	1.6	2.8	83	
0.0187	14.8	2.4	6.2	267	
0.0098	6.2	1.4	4.4	140	
18.8	157	0.039	4.025	14,700	55
1.4	660	3.3	200	810	56
7.3	430	0.56	768	4,200	57
26.2	360	0.33	1,091	40,000	
22.3	300	0.33	909	15,700	

소의 경우  $10^4 \sim 10^6$ 배의 범위에서 반응을 촉매한다<sup>43)</sup>에 필적할 정도의 촉매활성을 얻을 수 있다.

## ② 아마이드 결합의 가수분해반응

아미드(펩티드결합)의 가수분해반응을 촉매하는 항체는 배열 특이적인 인공 protease의 개발이나 의료응용에의 가능성이 있어 촉매항체의 연구분야에서 가장 흥미있는 테마라 할 수 있다. 아마이드결합의 가수분해 반응도 에스테르결합의 경우와 마찬가지로 4면체 중간체를 경유하여 진행된다. 그러나 에스테르의 경우와 크게 다른점은 4면체 중간체가 개열하기 전에 질소원자에 양성자화가 일어난다 (Fig. 5). 따라서 이 양성자화가 아마이드결합 개열의 속도 제한 단계로 작용하게 된다.<sup>46)</sup> 여기서 아마이드결합의 가수분해를 촉매하기 위해서는 양성자 공여체로 작용하는 촉매잔기를 항체의 항원결합부위에 유도시켜야 한다.

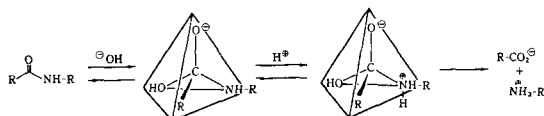
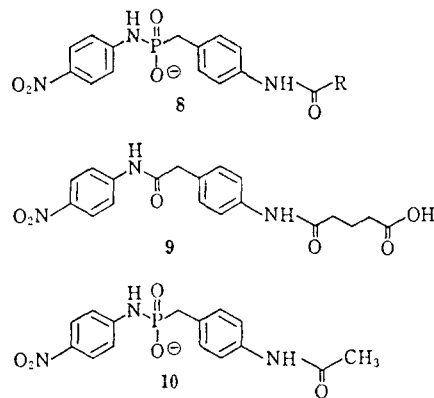


Fig. 5. Hydrolysis reaction of amide bonds.

Janda 등<sup>47)</sup>은 hapten으로 인산아미드(8)를 사용하여 면역시킴으로써 아마이드결합의 가수분해반응을 촉매하는 항체 제작에 성공하였다. 이 항체는 기질인 유도체 *p*-nitroanilide(9)를 무촉매 반응에 비해  $25 \times 10^5$ 배 만큼이나 빠른 속도로 가수분해하였다( $K_m = 370 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat} = 0.08 \text{ min}^{-1}$ ). 더구나 면역에 사용된 hapten과 같은 구조를 갖는 인산아미드(10)에 의한 저해실험의 결과로부터 흥미있는 사실이 얻어졌다( $K_i = 10 \mu\text{M}$ ).

전이상태 이론에 의하면  $K_m/K_i$ 값은 반응속도의 가속 ( $k_{cat}/k_{uncat}$ )범위와 일치하였다. 그러나 이 항체의 경우  $K_m/K_i$ 값은 100으로 만족하지 않고  $2.5 \times 10^5$ 배라는 반응속도의 가속을 나타내었는데 이는 전이상태의 안정화로는 설명할 수 없다. 이것은 항체의 항원결합부위에 양성자 공여체로서 기능하는 아미노산잔기가 존재하여 이 항체의 촉매활성에 기여하고 있을 가능성을 시사하고 있다. *p*-Nitroanilide 유도체와 같은 활성화된 아마이드결합의 가수분해

반응에 있어서 양성자화가 불필요한지 어떤지는 의문이 있지만 Lerner 등<sup>5)</sup>은 hapten으로 사용한 인산아미드가 양성자 공여성 아미노산잔기를 유도한다고 설명하고 있다.



즉, 인산아미드의 질소원자는 대응하는 카르본산아미드에 비해 강한 염기를 갖기 때문에 수소결합 등의 상호작용에 의해 항원 결합부위에 양성자 공여체로 작용하는 아미노산잔기를 유도한다.

최근, Carter와 Well<sup>48)</sup>은 serine protease의 촉매활성인자로 subtilisin을 사용하여 검토한 결과, serine protease는 활성부위의 histidine, aspartate 및 serine 잔기의 교묘한 전하 relay에 의해 촉매활성을 발현한다는 것을 알았다. 이들 아미노산잔기를 유전자 공학적 수법에 의해 alanine 잔기로 치환시킴으로써 이 변이 subtilisin은 촉매잔기가 없는 데도 불함하고 무촉매 하에 비해 3,000배의 촉매활성을 유지하였고, 이 값은 이 효소의 활성화에 있어서 전이상태의 안정화에 의한 기여로 해석될 수 있었다. Subtilisin의 전체 촉매활성( $10^5$ 배의 반응가속) 중 잔존활성은 활성부위의 촉매잔기의 기여에 의한 것이며, 이것은 높은 활성을 갖는 촉매항체를 설계하기 위해서는 항원 결합부위의 촉매잔기의 도입이 필요하다는 것을 시사하고 있다.

## ③ 환상 전자반응

전이상태의 안정화에 크게 기여하는 것으로서 활성화 엔트로피( $\Delta S^\ddagger$ )를 들 수 있다. 예를 들면, 용액 중에서의 반응이 늦어지는 것은 반응물질 사이를 접근 결합시킴으로써 큰 엔트로피의 손실을 수반하기 때문이다. 한편, 효

소반응은 효소-기질 복합체라는 계(system)에서 일어나며 각각의 반응물질들은 분자의 일부이기 때문에 전이상태 일 때도 병진이나 회전 엔트로피를 잃지 않는다(반응물질 사이의 병진 및 회전 엔트로피는 복합체 형성시에 잃게 된다). 효소는 반응물질끼리를 반응 상자속에서 정확한 배향(conformation)으로 규제한다.

이같은 반응의 효소-기질 복합체의 형성이 항체의 결합부위로 사용되어 행해졌다. 특히 환상 전자반응은 활성화 엔트로피가 가장 유효하게 작용하는 반응계라 생각된다. 예를 들면, chorismate(11)로부터 prephenate(12)에의 Claisen 전위는 세균이나 식물의 방향족 아미노산의 생합성 과정에서 chorismate mutase 에 의해 촉매되어 C-O결합의 개열과 C-C결합의 형성을 동시에 일으키면서 계속해서 6원환(員環) 전이상태(A)를 경유하여 진행된다(Fig. 6). 여기서 항체의 항원결합부위 중에서 기질의 반응부위를 6원환 전이상태로 규제시킴으로써 반응속도의 촉진이 기대된다. Schultz 등은 chorismate mutase의 전이상태 저해제(transition-state inhibitor)로 잘 알려져 있는 dicarboxylic acid (13)를 hapten으로 사용하여 항체를 제작하였다<sup>11)</sup>. 예상된 바와 같이 항체는 기질(11)의 Claisen 전위반응을 촉매한 반응속도의 가속은 무촉매 조건 하에 비해  $10^4$ 배에 도달하였다( $K_m=260\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=2.7\text{min}^{-1}$ ,  $10^\circ\text{C}$ ). 또 무촉매반응의 활성화 엔트로피( $\Delta S^\ddagger$ )가  $-12.9\text{eu}$ , 활성화 엔

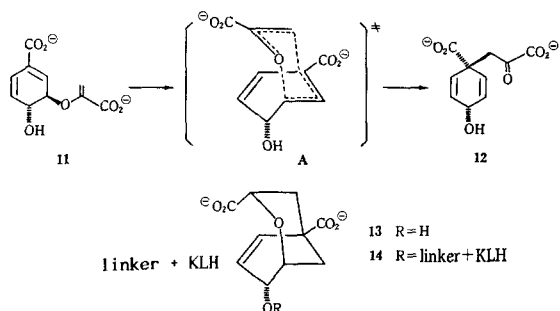


Fig. 6. The Claisen rearrangement of chorismate 11 into prephenate 12 and structure of the transition state analogue hapten 13.

탈피( $\Delta H^\ddagger$ )가  $20.5\text{Kcal/mol}$ 임에 대하여 항체촉매 하에서는  $\Delta S^\ddagger=-1.2\text{eu}$ ,  $\Delta H^\ddagger=20.5\text{Kcal/mol}$  그리고 활성화

엔트로피는 거의 0에 가까운 값을 나타내었다. 이상의 결과로부터 항체가 기질을 6원환 전이상태 형태로 입체적으로 규제하여 반응을 촉매하는 것으로 해석된다.

이러한 생각은 Diels-Alder 반응<sup>9, 10)</sup>이나 아미드결합 형성반응<sup>8)</sup> 등 2분자 반응에도 이용되어, 다기질 hapten을 사용한 촉매 항체의 제작이 행해지고 있다. Hapten(15)은 diene(16)과 dienophil(17)의 Diels-Alder 반응의 전이상태를 추정하여 설정되었다(Fig. 7).<sup>11)</sup> 이 hapten에서 얻

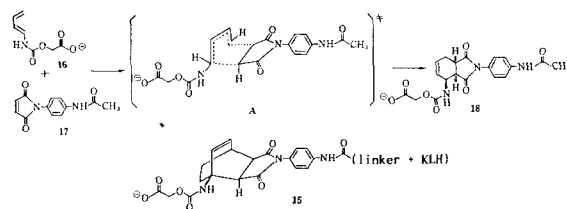


Fig. 7. Transition state analogue and Diels-Alder reaction.

어진 항체는 반응을 각 촉매 하에 비해 약 500배 가속하였다고 보고되었다( $16 : K_m=1,130\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/K_m=583\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ;  $17 : K_m=740\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}/K_m=900\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ). 그러나 이 항체는 기질보다도 생성물(18) 쪽에 강한 친화성을 나타내어 반응은 생성물에 의해 저해되었다. 즉 이같은 다기질 hapten의 경우, hapten의 구조는 기질보다도 오히려 생성물의 구조와 유사하기 때문에 생성물 저해를 받기 쉽다. 생성물 저해는 Diels-Alder 반응에 한정된 것이 아니라 많은 촉매항체에서도 관찰되어 이 문제는 앞으로 해결해야 할

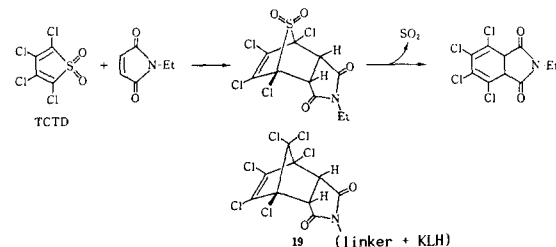


Fig. 8. Diels-Alder reaction of tetrachlorothiophene dioxide(TCTD).

과제가 되고 있다. Hievert 등<sup>10)</sup>은 Diels-Alder 반응의 기

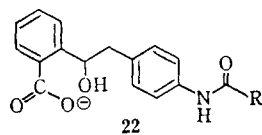
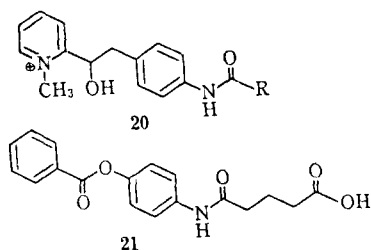


질로서 TCTD(tetrachlorothiophen dioxide)를 사용함으로써 생성물의 저해를 해결하였다(Fig. 8). TCTD는 Diels-Alder 반응 후 즉시 탈  $\text{SO}_2$ 반응이 일어나 최종생성물은 Diels 반응 생성물과는 다른 구조를 갖는다. 이들은 6원환 전이 상태 analogue(19)를 hapten으로 하여 항체를 제작하였다. 얻어진 항체는 반응을 약 100배 가속하여 50회 이상의 대사회전수가 관측되었다( $K_m=21\text{mM}$ ,  $k_{cat}=4.3\text{min}^{-1}$ ).

## 2) 촉매잔기의 도입(Bait-and-Switch법)

전이상태의 안정화에 이어 제 2 전략으로서 항원결합부위의 촉매잔기의 도입이 고려되고 있다.<sup>49)</sup> 항체와 hapten의 상호작용은 상당히 엄밀한 것이며, 항원결합부위에는 hapten의 성질에 상보적인 관능기가 존재한다. 예를 들면 음전하를 갖는 hapten에서 면역된 항체의 결합부위에는 양전하를 갖는 아미노산잔기가 유도된다. 또 역으로 양전하를 갖는 hapten의 경우에는 음전하를 갖는 아미노산잔기가 유도되는 경향이 있다. 따라서 양전하를 갖는 hapten으로 면역된 항체에 정전기적 상호작용이 없는 기질을 작용시키면 항원결합부위에 유도된 음전하의 아미노산잔기는 염기촉매로서 작용하게 된다.

Lerner 등<sup>49)</sup>은 항체-hapten 상보성을 이용한 촉매잔기의 유도를 "Bait-and-Switch법"이라 하였고, 이 방법으로 제작된 항체의 에스테르결합 가수분해반응에 대하여 보고하였다. 양전하를 갖는 hapten(20)에서 얻어진 항체는 기질인 에스테르(21)를 가수분해하며 무촉매에 비해  $10^6$ 배 이상이나 반응을 가속되는 것이 관찰되었다( $K_m=1.12\text{mM}$ ,  $k_{cat}=5 \times 10^{-3}\text{min}^{-1}$ ). 더구나 이 가수분해반응은 중성조건하(pH 7.2)에서 진행되며, 면역에 사용된 hapten에 의해 완전히 저해되었다( $K_i=83\mu\text{M}$ ). 또 촉매반응의 pH 의존성을 검토한 결과, 이 반응에는 pKa 6.26의 아미노산 잔기의 염기형( $\text{R-CO}_2^-$ )이 관여하고 있는 것으로 시사되었다.



즉, 양전하를 갖는 hapten과의 상보성에 의해 항원결합부위에 aspartate 또는 glutamate의 아미노산잔기가 유도되어, 이 염기형( $\text{R-CO}_2^-$ )이 가수분해 반응의 염기촉매로서 작용하고 있다고 해석된다(Fig. 9).

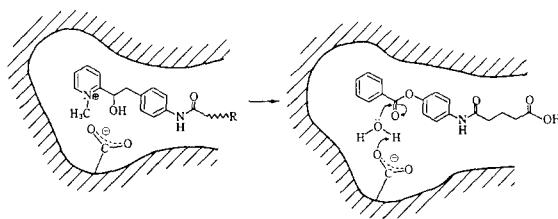
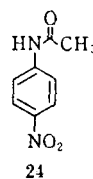
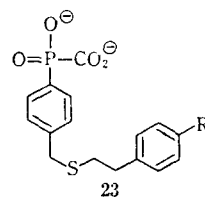


Fig. 9. Incorporation of catalytic residue by Bait-and-Switch method.

또 Janda 등<sup>50)</sup>은 음전하를 갖는 hapten에 대해서도 항체를 제작하였다. 이들은 hapten(22)에서 얻어진 항체에도 기질(21)의 가수분해 반응을 촉매하는 활성이 있다는 사실을 밝혔다( $K_m=246\mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=0.01\text{min}^{-1}$ ). 이 항체의 촉매활성은 arginine 수식시약(phenylglyoxal)에 의해 비가역적으로 저해되었다. 이 점에서 촉매반응에는 arginine 잔기가 촉매기로서 작용하고 있다는 것을 알 수 있다.



이상의 결과로부터 “Bait-and-Switch법”이 촉매항체 설계의 유력한 전략이라는 것이 이해될 수 있다. 오늘날 이 방법과 전이상태의 안정화 방법을 조합시켜 고효율 촉매항체의 제작이 검토되고 있다. 이미 기술한 바와 같이 아마이드 결합의 가수분해 반응을 촉매하는 데는 사면체 중간체 생성 후의 양성자화에 관여하는 관능기가 필요하다. 따라서 Schultz 등은 사면체 인산에스테르기의 근방에서 음전하를 도입한 hapten(23)을 설계하여 현재 얻어진 항체에 대하여 기질(24)의 가수분해반응을 검토 중에 있다.

### 3) Cofactor-결합부위

어떤 종류의 효소는 아미노산 이외의 촉매인자(cofactor 또는 보조소)를 사용하여 반응을 촉매한다. 탈수소효소는  $\text{NAD}^+$ 나  $\text{NADP}^+$ 를 보조소로 사용하고 있고, 또 많은 인산관여 효소는  $\text{Mg}^{2+}$ 를 필요로 한다. 이와 같이 촉매항체에도 촉매인자를 도입할 수 있다면 촉매할 수 있는 반응의 종류도 확대되고 촉매활성의 향상도 기대할 수 있다.

Lerner 등<sup>17)</sup>은 carboxypeptidase 등의 금속효소에 착안하여 금속이온 촉매에 의한 펩티드의 위치선택적 가수분해 반응에 성공하였다. 가수분해 반응에 있어서 금속이온 촉매 역할의 하나는 친핵 전자촉매로서 음전하를 안정화 시키는 것이다. Carboxypeptidase의 경우, 기질의 아마이드결합의 카르보닐산소가  $\text{Zn}^{2+}$ 에 배위한다. 그 결과 아마이드기는 친핵공격을 받기 쉽도록 분극되어 전이상태가 안정화된다(Fig. 10).

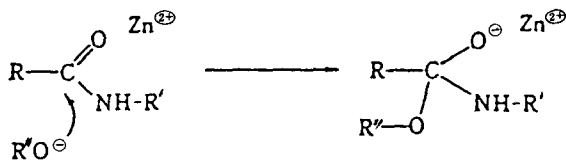
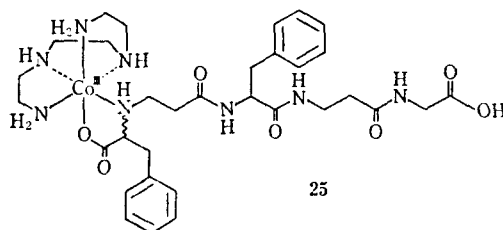


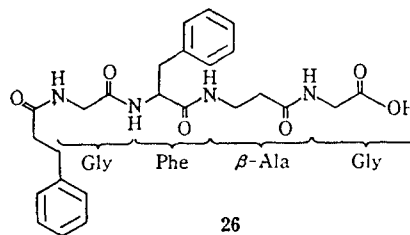
Fig. 10. Metal ion catalysis.

이 기구에 의한 모델시험에서 반응의 촉진도는  $10^4 \sim 10^6$ 으로 추정된다.<sup>51)</sup> 또 하나의 역할은 금속에 배위된 물이 강력한 친핵체로 된다. 예를 들면 Co에 결합된 물은 pKa 6.6에서 해리된다. 이것은 유리의  $\text{H}_2\text{O}$ 의 pKa보다 9정도 낮고, 중성조건 하에서도 친핵성 수산기를 공급한다. pKa가 7.0인 염기는 일반 염기촉매로서 유효한 것과 마찬가지로

pKa가 약 7.0인 금속결합수는 친핵공격에 효과가 있다. 이들은 Gly-Phe- $\beta$ Ala-Gly의 N말단에 Co(III)의 triethylenetetramine(trien)착체를 맞추어 넣은 peptide(25)를 합성하고, 이것을 hapten으로 하여 항체를 제작하였다. 얻어진 항체는 기질(26)의 Gly-Phe 아마이드결합을 위치선택적 또는 촉매적으로 가수분해하였다( $k_{cat} = 6 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ ). 이것은 무촉매에 비해  $2 \times 10^4$ 배나 반응을 촉진시켰다. 또 이 촉매반응은 항체, 금속이온, trien 등의 3 가지 인자를 필요로 하며, 이 중 어느 하나가 없어도 반응이 가속되지 않았다. 현재 이 보고는 펩티드(불활성 아마이드)결합을 성공적으로 가수분해한 유일한 예이며, 앞으로 인공 pro-tease개발의 가능성을 시사하고 있다.



25



26

오늘날까지 금속이온 이외의 cofactor로서 flavin,<sup>13)</sup> pyridoxal, porphyrin<sup>52)</sup>등을 이용한 촉매항체의 예가 보고되어 있다. 항체의 다양성은 이같은 천연보조소에 한정되지 않고 비천연 cofactor에 대한 결합부위를 구축할 수 있어 천연효소로는 촉매할 수 없는 반응도 촉매할 수 있는 촉매항체의 개발이 기대된다.

## 4. 결 론

1986년에 촉매항체의 성공 예가 최초로 보고된 이래 반응의 종류, 촉매활성 및 기질특이성에 대한 촉매작용의 가능성이 추구되고, 또 촉매설계를 위한 여러가지 방법론이

전개되고 있다. 어떤 serine protease에서 볼 수 있는 “electric charge relay system”도 교묘한 hapten설계로 구축할 수 있게 되었다. 효소가 그 촉매활성을 위해 여러가지 인자를 이용하고 있는 바와 같이, 촉매항체가 반응속도를  $10^8$  배 이상이나 가속시킬 수 있는 높은 활성을 획득하기 위해서는 이미 기술한 촉매인자의 조합이나 그 이외의 인자를 도입해야 할 것이다. 그리고 이같은 연구과정에서 얻어진 지견은 효소의 분자인식이나 촉매의 활성본체를 해명하고 있는 단백질화학 분야에 크게 공헌할 것이다.

물론 촉매항체를 설계하는 데 있어서 해당되는 효소에 대해서도 공부하는 것이 중요하며, 또 그 촉매활성을 평가하는 데는 해당 효소와 비교할 필요가 있다. 그렇지만 효소 쪽으로 지나치게 사로잡히게 되면 촉매항체가 항체로서의 의의를 잃게 될 것이다. 항체와 효소, 원래 이 두가지 단백질은 생체내에서 전혀 다른 역할을 수행하기 위해 진화되어 왔다. 효소의 특징은 그것이 갖는 촉매능이며 항체는 다종다양한 물질을 특이적으로 인식하는 능력이다. 실제 광학활성 화합물의 가수분해 반응을 촉매하는 항체 중에는 효소를 능가하는 높은 광학순도를 갖는 것도 보고되어 있다. 촉매항체란 종래의 효소로는 일으킬 수 없는 반응을 매우 특이적으로 촉매할 수 있는 항체라고 할 수 있지 않을까?

촉매항체의 매력은 합리적인 hapten의 설계로 원하는 촉매활성을 갖는 항체를 유도하는 데 있다. 이에 관한 연구가 번역화학자나 단백질 화학자 뿐만아니라 유기화학자를 매료하고 있는 이유도 바로 여기에 있다고 본다. 높은 활성을 갖는 촉매항체를 유도할 수 있는 이유는 반드시 항체의 다양성과 돌연변이에 의하기 때문이라고는 결론을 내릴 수 없다. 따라서 앞으로 어떤 하나의 촉매항체에 대해서 몇가지 기질과 저해제를 사용하여 hapten과 촉매활성과의 상관관계를 상세히 검토할 수 있는 기초적인 연구가 필요하다고 본다.

### 참 고 문 헌

1. Lern, J., *Science*, **227**, 849(1985).
2. Kaiser, E. T., *Science*, **226**, 505(1984).
3. Knowles, J. R., *Science*, **236**, 1252(1987).
4. Seiler, F. R., Gronski, P., Kurrle, R., Luben, G., Harthus, H. P., Bosslet, W. A. K., Schwick, H. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 139(1985).
5. Lerner, R. A., Benkovic, S. J., Schults, P. G., *Science*, **252**, 659(1991).
6. Tramontano, A., Janda, K. D., Lerner, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6736(1986).
7. Pollack, S. J., Jacobs, J. W., Schultz, P. G., *Science*, **234**, 1570(1986).
8. Benkovic, S. J., Napper, A. D., Lerner, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5355(1988).
9. Braisted, A. C., Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7430(1990)
10. Hilvert, D., Hill, K. W., Nared, K. D., Auditor, M. T. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9261(1989)
11. Jackson, D. Y., Jacobs, J. W., Reich, S., Sugasawara, R., Bartlett, P. A., Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 4841(1988).
12. Cochran, A. G., Sugasawara, R., Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7888(1988).
13. Shokat, K. M., Leumann, C. J., Sugasawara, R., Schultz, P. G., *Angew. Chem. Int. Engl.*, **27**, 1171(1988).
14. Janjic, N., Tramontana, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9109(1989).
15. Iverson, B. L., Cameron, K. E., Jahangiri, G. K., Pasternak, D. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5320(1990).
16. Shokat, K. M., Leumann, C. J., Sugasawara, R., Schultz, P. G., *Nature*, **338**, 269(1989).
17. Iverson, B. L., Lerner, R. A., *Science*, **243**, 1184(1989).
18. Janda, K. D., Weinhouse, M. T., Schloeder, D. M., Lerner, R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1274(1990).
19. Janda, K. D., Benkovic, S. J., Lerner, R. A., *Science*, **244**, 437(1989).
20. Pollack, S. J., Hsiun, P., Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5961(1989).
21. Nisonoff, A. : In *Introduction to Molecular Immunology*, Sinaure Association Inc., Sunderland, MA., p. 26 (1985).
22. Chothia, C., Lenk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M.,

- Smith-Gill, S. J., Sheriff, S., Poljak, R. J., *Nature*, **342**, 877(1989).
23. Amit, A. G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. V., Poljak, R. J., *Science*, **233**, 747(1988).
24. Colman, P. M., Laver, W. G., Varghee, J. N., Baker, A. T., Tulloch, P. A., Air, G. M., Webster, R. G., *Nature*, **326**, 358(1987).
25. Davis, M. M., Bjorkman, P. J., *Nature*, **334**, 395 (1988).
26. Nisonoff, A., Hopper, J., Spring, S., In *The Antibody*, Academic Press, New York, p. 132(1975).
27. Codman J. W., Antigenic Determinants and Antibody Compiding Sites, Chap. 2. In *The Antigens*, (ed. Sela, M.), Vol. 3, Academic Press, New York, p. 85(1975).
28. Karu, A. E., Schmidt, D. J., Clarkson, C. E., Jacobs, J. W., Swanson, T. A., Egger, M. L., Carlson, R. E., Van Emm, J. M., Detection of Avermectins with Monoclonal Antibodies, Chap 10, In *Food Safety and Pesticide Residues*, American Chemical Society, Washington D. C., p. 265(1990).
29. Wilewich, L., Gomez-Sanches, C., MacDonald, P. C., Siiteri, P. K., *J. Steroid Biochem.*, **6**, 1381(1975).
30. Karush, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5519(1956).
31. Harada, A., Kamachi, M., *Bio Industry*, **8**, 36(1991).
32. Makela, O., Seppala, I. J. T., In *Handbook of Experimental Immunology*(Ed. Weir, D. M.), Vol. 1, Chap. 3, 8, Blackwell Scientific Pub., Oxford(1986).
33. Erlanger, B. F., *Meth. Enzymol.*, **70**, 85(1980).
34. Schultz, P. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 1283 (1989).
35. Fujii, I., *Farumashia*, **28**, 263(1992).
36. Pollack, S. J., Shultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 1929(1989).
37. Baldwin, E., Schultz, P. G., *Science*, **245**, 1104(1989).
38. Pauling, L., *Am. Sci.*, **36**, 51(1948).
39. Schultz, P. G., Lerner, R. A., Benkovic, S. J., *Chem. Eng. News.*, **68**, 28(1990).
40. Shokat, K. M., Schultz, P. G., *Annu. Rev. Immunol.*, **8**, 335(1990).
41. Lerner, R. A., In *Proceeding of The X VIIIth Solvay Conference on Chemistry*, Design and Synthesis of Organic molecules Based on Molecular Recognition, p. 43 (1983).
42. Hammond, G. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 334(1955).
43. Lienhard, G. E., *Science*, **180**, 149(1974).
44. Wolfenden, R., *Acc. Chem. Res.*, **5**, 10(1972).
45. Jacobs, J. W., *Bio/Technology* **3**, 258(1991).
46. Jencks, W. P., In *Catalyst in Chemisty and Enzymology*, pp. 354, 524, McGraw-Hill, New York(1969).
47. Janda, K. D., Schloeder, D., Benkovic, S. J., Lerner, R. A., *Science*, **241**, 1188(1988).
48. Carter, P., Wells, J. A., *Nature*, **332**(1988).
49. Jenda, K. D., In *National Meeting of the American Chemical Society*, New Orleans LA, ORGN 196(1987).
50. Janda, K. D., Weinhouse, M. I., Danon, T., Pacelli, K. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5427(1991).
51. Buckingham, D. A., Davis, C. E., Foster, d. M., Sargenson, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5571(1970).
52. Cochran, A. G., Schults, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9411(1990).
53. Pollack, S. J., Schults, P. G., *Cold Spring Harbar. Symp. Quant. Biol.*, **52**, 97(1987).
54. Tramontano, A., Ammann, A. A., Lerner, R. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2282(1988).
55. Durfor, C. N., Bolin, R. T., Sugasawara, R., Jacobs, J. W., Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8713 (1988).
56. Jacobs, J. W., Schultz, P. G., Sugasawara, R., Powell, M., *J. Am. Soc.*, **109**, 2174(1987).
57. Jacobs, J. W., In *Catalytic Antibody*, Thesis, Department of Chemistry, Univ. of California, Berkeley(1989).