



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **311432**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 16/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19922921	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.01.24. PCT/US91/00507
(22) Inng. dag	1992.07.23	(85) Videreføringsdag	1992.07.23
(24) Løpedag	1991.01.24	(30) Prioritet	1990.01.26. US. 470924
(41) Alm. tilgj.	1992.09.25		1991.01.23. US. 644909
(45) Meddelt dato	2001.11.26		
(83) Mikroorganisme deponert:	ATTC nr 10341, 10621, 10622		

(71) Patenthaver	Scripps Clinic and Research Foundation, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037-1093, US
(72) Oppfinner	Kim D. Janda, San Diego, CA, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) **Benevnelse** **Molekyler med antistoffkombinerende seter som katalyserer hydrolysereaksjoner**

(56) **Anførte publikasjoner** Janda et. al, Introduction of an antibody that catalyzes the hydrolysis of an amide bond, Science, vol 241, 2.sept, 1988, pp 1188-1191
Powell and Hansen, Catalytic antibodies-a new direction in enzyme design (review), Protein engineering, vol 3, no 2, pp 69-75, 1989
Lerner, R.A. et al, BioEssays, Vol 9, No. 4, oktober 1988, side 107-112
Janda, K.D. Biotechnol. Prog., 1990 6, side 178 - 181
Janda, K.D. et al, J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, side 1274 - 1275
Shokat, K.M. et al, Nature, Vol 338, 16 mars 1989, 269 - 271

(57) **Sammendrag**

Et antistoffmolekyl eller molekyl inneholdende antistoffkombinerende setedeler (katalytisk molekyl) som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, metoder for fremstilling og anvendelse av det katalytiske molekyl, og celler som produserer disse molekyler, er beskrevet. De katalytiske molekyler binder til en reaktantligand inneholdende den binding som skal hydrolyseres og også til en hapteniske ligand. Den hapteniske ligand er strukturelt analog med angitte reaktantligand og inneholder et tetraedrisk

carbonatom som er bundet til en hydroxylgruppe og til et mettet carbonatom ved en stilling i den hapteniske ligand som tilsvarer stillingen av carbonylgruppen og dens bundne heteroatom av reaktantliganden. Den hapteniske ligand inneholder også en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier som ikke er til stede ved en tilsvarende stilling av reaktantliganden. Den ioniske, ladningsbærende gruppe er lokalisert i haptenet innen 7 Ångstrøm av det tetraedriske carbonatom.

Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse angår antistoffer, antigener og immunogener, og nærmere bestemt molekyler som inneholder et antistoffkombinerende sete som binder det tetraedriske carbon-atom av en amid- eller esterhydrolyseomvandlingstilstand og omgivende strukturer, og tilveiebringer enn videre et sete for syre-base eller nukleofil katalyse av amid- eller esterbindingen som hydrolyseres.

10 Bakgrunn for oppfinnelsen

Bindingsfenomener mellom ligander og reseptorer spiller mange avgjørende roller i biologiske systemer. Eksempler på slike fenomener er bindingen av oxygenmolekyler til deoxyhemoglobin under dannelselse av oxyhemoglobin, og bindingen av et substrat til et enzym som virker på dette slik som mellom et protein og en protease slik som trypsin. Ytterligere eksempler på biologiske bindingsfenomener innbefatter bindingen av et antigen til et antistoff, og bindingen av komplekskomponent C3 til den såkalte CR1-reseptor.

20 Mange legemidler og andre terapeutiske midler er også antatt å være avhengige av bindingsfenomener. Eksempelvis er opiater slik som morfin, rapportert å bindes til spesifikke reseptorer i hjernen. Opiatagonister og -antagonister er angitt å konkurrere med legemidler slik som morfin, for disse bindingsseter.

25 Ligander slik som syntetiske legemidler, som morfin og dets derivater, og de som er naturlig forekommende i biologiske systemer slik som endorfiner og hormoner, binder til reseptorer som er naturlig til stede i biologiske systemer, og vil bli behandlet sammen her. Slik binding kan føre til et utall fenomener innen biologien, innbefattende i særdeleshet hydrolyse av amid- og esterbindinger slik som der hvor proteiner hydrolyseres til konstituentpolypeptider av et enzym slik som trypsin eller papain, eller hvor et fett spaltes til glycerol og tre carboxylsyrer.

Slobin, Biochemistry, 5:2836-2844 (1966) rapporterte fremstilling av antistoffer mot et p-nitrocarbобензоxykonjugat av kvegserumalbumin. Disse antistoffer ble deretter anvendt

for å hydrolysere p-nitrofenylacetat- og epsilon-aminocaproat-
estere. Reaksjonen av acetatesteren ble beskrevet ved en
annen-ordens hastighetskonstant og ble angitt å fremkomme som
ikke-spesifikk. Den annen-ordens hastighetskonstant erholdt
5 under anvendelse av normalt gammaglobulin, ble angitt å være
tilnærmet lik den til de spesielt fremstilte antistoffer. Nær-
været av de spesielt fremstilte antistoffer ble angitt å inhi-
bere hydrolysen av aminocaproatesteren.

Kohen og medarbeidere rapporterte også forsøk ved
10 anvendelse av antistoffer på å hydrolysere esterolyse. Anti-
stoffene anvendt av denne gruppe, var i hvert tilfelle dannet
mot en del av det sluttelig anvendte substratmolekyl som ikke
inneholdt bindingen som skulle hydrolyseres.

I sitt første arbeide [FEBS Letters, 100:137-140
15 (1979) og Biochim. Biophys. Acta, 629:328-337 (1980)] ble
anti-steroid-antistoffer anvendt for å hydrolysere 7-umbelli-
feron- (7-hydroxykumarin) estere av en carboxyethylthioether
av et steroid. I hvert tilfelle ble en økning i hydrolytisk
hastighet observert sammenlignet med bakgrunnen eller en has-
tighet erholdt med normalt IgG. I begge tilfeller var omslags-
20 tall lave (ca. ett mol substrat pr. mol antistoff pr. minutt,
eller mindre), og reaksjonshastighetene avtok med tiden og
nådde et nivå med metning av antistoffet. Denne nedsettelse i
hastighet ble tilskrevet en irreversibel binding av det
25 steroidale syreprodukt til antistoffet.

Kohen et al. rapporterte også hydrolyse av 7-[N-(2,4-
dinitrofenyl)-6-aminohexanoyl]-kumarin under anvendelse av
monoklonale antistoffer dannet mot dinitrofenylidelene av dette
substratmolekyl [FEBS Letters, 111:427-431 (1980)]. Her ble
30 også en hastighetsøkning over bakgrunnen rapportert, men reak-
sjonen ble angitt å være støkiometrisk snarere enn katalytisk.
En nedsettelse i hastighet som nærmet seg null, ble rapportert
ettersom metning av antistoffet var nådd. Igjen ble reduk-
sjonen tilskrevet produktinhibering forårsaket av binding av
35 produktsyren til antistoffet da noe av den opprinnelige hydro-
lyseaktivitet kunne regenereres ved kromatografi av en anti-
stoff-substrat-produktblanding.

Når sterk antistoffbinding rettes mot stabile til-

stander av substratmolekyler, vil den langsomme dissosiasjonshastighet av komplekset vanskeliggjøre katalyse. Dette er antatt å være situasjonen for resultatene rapportert av Kohen og medarbeidere.

5 De ovenfor angitte teorier er, selv om de er interessante, sterkt begrenset av mangelen på å rette oppmerksomheten mot mekanismen ved bindingsenergiutnyttelsen som er vesentlig for enzymer [W. P. Jencks, Adv. Enzymol., 43, 219 (1975)].

10 Disse mangler kan avhjelpes ved anvendelse av en overgangstilstandsanalog som haptenet, for å fremkalle de ønskede antistoffer. Dette haptenet kan anta rollen av en inhibitor i det katalytiske system.

15 Således kan immunologisk binding anvendes for eksperimentelt å omløse bindingsinteraksjoner til katalytiske prosesser. Eksempelvis ble det foreslått at anvendelse av et antistoff mot en hapteniske gruppe som ligner overgangstilstanden av en gitt reaksjon, skulle forårsake en akselerasjon i substratreaksjon ved å tvinge substrater til å etterligne overgangstilstanden. Jencks, W.P., Catalysis in Chemistry and Enzymology, side 288 (McGraw-Hill, New York 1969). Til tross for denne brede antydning ble spesifikke overgangstilstandshaptener ikke foreslått, heller ikke ble spesifikke reaksjoner foreslått i hvilke dette begrepet kunne testes.

25 Hydrolyse av amid- og esterbindinger er antatt ved nyere akseptert kjemisk teori å forløpe i vandige medier ved en reaksjon ved carbonylcarbonatomet under dannelse av en overgangstilstand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til (a) et carbonatom av syredelen av amidet eller esteren, (b) to oxygenatomer hvor ett er fra carbonylgruppen
30 og den andre fra et hydroxylion eller vannmolekyl av mediet, og (c) oxygenatomet av alkoholdelen av en ester eller nitrogenatomet av amindelen av et amid. Overgangstilstander av slike reaksjoner er anvendbare mentale konstruksjoner som ved definisjon ikke kan isoleres, sammenlignet med mellomprodukter
35 som er isolerbare. Selv om de ovenfor angitte hydrolytiske overgangstilstander ikke kan isoleres, er en stor mengde vitenskapelig litteratur blitt viet dette.

 Mens den ovenfor beskrevne overgangstilstand for

amid- og esterhydrolyse er antatt å være vel forstått, er parametrene av topologien, f.eks. størrelse, form og ladning av reseptorbindingssetene i hvilke bestemte amider, slik som proteiner, eller estere slik som fett, reagerer gjennom disse
5 overgangstilstander, ikke godt forstått. Det vil derfor være gunstig hvis topologien av et flertall av bindings seter var kjent slik at interaksjonene av ligandene som binder i disse seter, kunne studeres. Uheldigvis er topologien av reseptorbindings seter i biologiske hydrolyser generelt ukjent, bortsett fra et relativt lite antall enzymer hvis røntgenkrystall-
10 strukturer er blitt bestemt.

Denne mangel på kunnskap om bindingssetetopologi stammer delvis fra en mangel på kunnskap av selv lokaliseringen i celler av mange bindings seter av reseptorer. I tillegg
15 er for de reseptorbindings seter hvis lokalisering er kjent, den kjemiske identitet, dvs. protein- og carbohydrats sammensetningen av bindingssetet, generelt ukjent. Således er forskeren generelt hindret i å søke å forstå de topologiske krav av reseptorbindings seter og derfor i å søke å konstruere terapeutiske midler som kan oppfylle disse krav.
20

Forskerne må derfor utprøve potensielle terapeutiske midler i dyre- eller cellekulturstudier for å fastslå hvorvidt et potensielt terapeutisk middel kan være anvendbart. Selv om slike systemer er anvendbare, er de kostbare og tidkrevende å
25 anvende.

Selv hvor topologien og kjemisk reaktivitet av en hydrolytisk reseptor slik som et enzym, er kjent, spalter enzymer slik som hydrolytiske proteaser, typisk sine substrater, polypeptidkjeder, tilstøtende en bestemt aminosyrerest som kan
30 oppstå flere ganger i polypeptidkjeden til proteinet. Selv om slik relativt vilkårlig spaltning kan være anvendbar når det gjelder å oppnå et polypeptidkart av proteinet, er denne relativt vilkårlige spaltning ikke anvendbar hvor det er ønskelig å fremstille bestemte aminosyrerestsekvenser.

35 Eksempelvis har moderne genetiske konstruksjonsteknikker vært anvendbare ved fremstilling av fusjonsproteiner som inneholder et ønsket protein eller polypeptid fusjonert til transkripsjonsproduktet av et vektorgen slik som lac z-

genet. Anvendelse av slike fusjonsproteiner hindres imidlertid av nærvær av fragmenter av vektorgenproduktet. Det vil derfor være gunstig hvis proteolytiske enzymlignende molekyler kunne utvikles som vil spalte slike fusjonsprodukter mellom de

5 ønskede og uønskede fusjonspolypeptid- eller proteindeler.

Nylig rapporterte Lerner, Tramontano og Janda [Science, 234, 1566 (1986)] om monoklonale antistoffer som hydrolyserte en ester katalytisk. Tramontano og Lerner beskriver også anvendelse av monoklonale antistoffer for å

10 hydrolysere estere i US patentskrift nr. 4 656 567. Pollack, Jacobs og Schultz [Science, 234, 1570 (1986)] rapporterte om et myelomprotein angitt som MOPC167 [Leon et al., Biochem., 10, 1424 (1971)] som katalyserer hydrolysen av et karbonat.

I de to Lerner og Tramontano-beskrivelser ble anti-

15 stoffene dannet mot et fosfonat som ble syntetisert for å representere en stabil analog av den tetraedriske, hydrolytiske omvandlingstilstand av carboxylsyreesteren eller carbonatesteren. Det prinsipielt diskuterte antistoff ifølge Pollack et al. var et myelomprotein som lyktes å binde til et

20 fosfonat som var strukturelt analogt med carbonatanalogen som ble hydrolysert.

I Lerner og Tramontano et al.-arbeidet ble således det substrat som skulle hydrolyseres, utvalgt på forhånd, og den immuniserende analog og hydrolytiske antistoffer ble syntetisert i henhold til det ønskede produkt. Pollack et al.

25 utformet det substrat som skulle hydrolyseres så snart de kjente spesifisiteten av myelomproteinet. Pollack et al. rapporterte også (ovenfor) eksistensen av et katalytisk antistoff, substrat og analogt substratsystem for karbonat-

30 hydrolyse som er lik i begrep med det ifølge Lerner et al. Arbeide vedrørende dette system er rapportert i Jacobs et al., J. Am. Chem. Soc., 109, 2174 (1987).

Publisert patentsøknad WO 85/02414 diskuterer mulig bruk av antistoffer som katalysatorer og presenterer data ved-

35 rørende anvendelse av polyklonalt serum når det gjelder hydrolyse av o-nitrofenyl-beta-D-galactosid. De antistoffer som er anvendbare i denne søknad, er angitt å kunne fremkalles av en reaktant, et reaksjonsmellomprodukt eller en analog av reak-

tanten, produktet eller reaksjonsmellomproduktet. Uttrykket "analog" er her definert til å omfatte isomerer, homologer eller andre forbindelser som ligner reaktanten tilstrekkelig når det gjelder kjemisk struktur til at antistoff dannet mot en analog, kan delta i en immunologisk reaksjon med reaktanten, men som ikke nødvendigvis vil katalysere en reaksjon av analogen.

Dataene tilveiebrakt i denne beskrivelse, indikerer bare at en viss spaltning av substrat- (reaktant) galactosidet fant sted i løpet av en 18-timersperiode under anvendelse av et relativt konsentrert antistoffpreparat (1:10 og 1:20 for-
tynninger). Selv om katalyse ble påstått, ble katalytisk aktivitet ikke vist da ikke noe omslag av det påståtte, katalytiske antistoff ble vist, heller ikke var det noen indikasjon på nærvær av spaltet substratgalactosid. Denne søknad indikerer at beta-D-galactosidase spaltet ca. ti ganger så mye substrat som de polyklonale antistoffer, idet man antar linearitet av absorbans ved den ikke angitte konsentrasjon av det studerte substrat.

Fra dataene presentert i den søknad, er det mulig at en nukleofil erstatning av o-nitrofenylgruppen fant sted med en terminal aminogruppe av en lysinrest av det anvendte antistoffpreparat. Således kan den observerte absorbans skyldes dannelse av epsilon-amino-lysinylo-nitrofenylanilin eller dannelse av et epsilon-amino-lysinyl-galactosid og o-nitrofenol, idet forekomster av det ene eller andre av disse ikke vil være katalytiske da antistoffet ble forbrukt snarere enn å slå over.

US patentskrift nr. 4 792 446 tilhørende Kim et al., beskriver produksjonen av antistoffkatalysatorer. Disse katalysatorer reagerer med et substrat og fremkalles av et haptensmolekyl hvor substratet og haptensmolekylene har hovedsakelig strukturell likhet i deler som er forskjellige fra atomet eller gruppen ved hvilken den katalytiske reaksjon finner sted, dvs. reaksjonssetet. Ved reaksjonssetet avviker substratet og haptenet ved at reaksjonssetet eller katalytisk aktive kjerner av haptenet inneholder en høyere valens og én eller flere bindinger enn den analoge struktur av substratet.

I tillegg innbefatter haptenet en gruppe som er bundet til den katalytisk aktive del av molekylet, dvs. til den strukturelt analoge del av det reaktive sete av substratet. Denne tilsatte gruppe er angitt å være anvendbar for innføring i katalysatorantistoffet av en pluss-ionisk ladning slik som med en -CO_2^- -gruppe, eller en minus-ionisk ladning slik som med et ammoniumion. Denne adderte gruppe er også angitt å erstatte -OH -gruppen av substratet, for å skape polare omgivelser, for å skape ikke-polare omgivelser eller for å tilveiebringe et hulrom for vann.

Lerner et al., BioAssays, 9:107-112 (1988) beskriver også anvendelse av en ionisk ladet gruppe av et immuniserende haptent for å fremkalle nærvær av en motsatt ladet gruppe i det antistoffkombinerende sete slik at syre-basekatalyse kan lettes under anvendelse av et uladet substrat. Denne strategi for fremkallelse av katalytiske antistoffer er her angitt som "lokke og dreie" ved at det katalytiske antistoff fremkalles eller lokkes med et ladet haptent og substratet for den fremkalte antistoffkatalysator dreies til et nøytralt molekyl slik at den komplementære, ioniske ladning fremkalt i antistoffet mot den ioniske ladning av haptenet, kan utnyttes til å tilveiebringe syre-basekatalyse av en reaksjon av det nøytrale substrat. Ikke noen spesifikke, hapteniske strukturer er imidlertid beskrevet for utførelse av "lokke og dreie"-strategien.

Kort sammendrag av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse omfatter antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, hvor det antistoffkombinerende sete av angitte molekyler binder til:

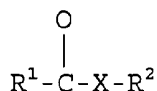
- (a) en reaktantligand inneholdende den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres; og
- (b) en haptenisk ligand strukturelt analog med angitte reaktantligand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe så vel som til et mettet carbonatom ved en stilling i den hapteniske ligand svarende til

stillingen av carbonylgruppen så vel som til det carbonyl-
bundne heteroatom av den på forhånd valgte carboxylsyreamid-
eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken haptensisk
ligand ytterligere innbefatter en gruppe som bærer en ionisk
5 ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier, og
hvor den ioniske, ladningsbærende gruppe er fraværende fra en
tilsvarende stilling på angitte reaktantligand og lokalisert
innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7 Ång-
strøm fra angitte, tetraedriske carbonatom.

10 Oppfinnelsen omfatter også monoklonale antistoff-
molekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende
setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxyl-
syreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk,
hvor det antistoffkombinerende sete av angitte molekyler
15 binder til:

(a) en reaktantligand inneholdende den på forhånd
valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolys-
eres, hvilken reaktantligand er representert ved strukturen

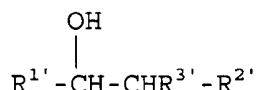
20



hvor R^1 og R^2 betegner carbonatomholdige, kjemiske rester av
25 reaktanten, og

-X- er -O- eller -NR³-, hvor R^3 er hydrogen eller en tredje
carbonholdig, kjemisk rest; og

(b) en haptensisk ligand som er strukturelt analog med
angitte reaktantligand, hvilken haptensisk ligand er
30 representert ved strukturen



35

hvor $\text{R}^{1'}$ og $\text{R}^{2'}$ betegner carbonatomholdige rester som er
strukturelt analoge med R^1 og R^2 , og hvor minst én av $\text{R}^{1'}$ og $\text{R}^{2'}$
inneholder en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig løs-
ning ved fysiologiske pH-verdier, minst én av angitte grupper

som tilveiebringer ionisk ladning ved fysiologiske pH-verdier, er lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på

5
$$\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{---CH---} \end{array}$$
 ca. 7 Ångstrøm fra angitte -CH-gruppe av angitte struktur, og hvor $R^{3'}$ er H når -X- er -O-, eller hvor $R^{3'}$ er strukturelt analog med R^3 når -X- er -NR³-.

Også omfattet av oppfinnelsen er celler som når de dyrkes i et medium, danner monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende anti-stoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, hvor det antistoffkombinerende sete av angitte molekyler binder til:

15 (a) en reaktantligand inneholdende den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres; og

(b) en haptenisk ligand strukturelt analog med angitte reaktantligand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe så vel som til et mettet carbonatom ved en stilling i den hapteniske ligand svarende til stillingen av carbonylgruppen, så vel som til det carbonylbundne heteroatom, av den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken haptenisk ligand ytterligere innbefatter en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier, hvilken ionisk ladningsbærende gruppe er fraværende fra angitte reaktantligand og lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7 Ångstrøm fra angitte, tetraedriske carbonatom.

Oppfinnelsen omfatter også metode for katalytisk hydrolysering av en på forhånd valgt ester- eller amidbinding i et raktivt ligandmolekyl omfattende trinnene:

(a) blanding av en katalytisk effektiv mengde av de monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler ifølge krav 1 med angitte reaktantligandmolekyler i et vandig medium under dannelsen av en reaksjonsblanding; og

(b) opprettholdelse av angitte reaksjonsblanding i et tidsrom tilstrekkelig til at angitte reaktantligandmolekyler binder til angitte antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkominerende setedeler, og til at angitte antistoffmolekyler eller molekyler innehldende antistoff-kombinerende setedeler derav får hydrolysere angitte på forhånd valgte binding katalytisk og danne produkter.

Også omfattet av oppfinnelsen er en metode for fremstilling av celler som når de dyrkes i et medium, danner antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, omfattende trinnene:

(a) immunisering av et dyr med et immunogen som innbefatter en haptensisk ligand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe så vel som til et mettet carbonatom ved en stilling i den haptensiske ligand svarende til stillingen av carbonylgruppen, så vel som til det carbonylbundne heteroatom, av den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken haptensisk ligand ytterligere innbefatter en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier hvor den ioniske, ladningsbærende gruppe er fraværende fra en tilsvarende stilling av angitte reaktantligand og lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7 Ångstrøm fra angitte tetraedriske carbonatom;

(b) opprettholdelse av angitte dyr i et tidsrom tilstrekkelig til at det angitte dyr får utskille antistoffer som immunreagerer med angitte, haptensiske ligand;

(c) overføring av gener som koder for antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra antistoffproduserende celler av angitte, opprettholdte, immuniserte dyr fra trinn (b) i vertceller under dannelse av hybridceller som inneholder gener fra minst to kilder, og hvilke dannede hybridceller (i) produserer antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra angitte, overførte gener når de dyrkes, og (ii) kan dyrkes hovedsakelig ubegrenset;

(d) dyrkning av hybridcellene i et egnet dyrkningsmedium i et tidsrom tilstrekkelig til at disse hybridceller får produsere antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler;

5 (e) gjenvinning av antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra de dyrkede hybridceller;

(f) screening av de erholdte antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler for å
10 identifisere en hybridcelle som produserer antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer angitte på forhånd bestemte carboxylsyreamid- eller esterbinding katalytisk; og

(g) dyrkning av kloner av angitte, identifiserte
15 hybridcelle som produserer antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer angitte på forhånd bestemte carboxylsyreamid- eller esterbinding.

Foreliggende oppfinnelse tar i betraktning et antistoffmolekyl eller molekyl inneholdende antistoffkombinerende setedel (katalytisk molekyl) som katalytisk hydrolyserer en på
20 forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand, metoder for fremstilling og anvendelse av et slikt molekyl, og celler som fremstiller katalysatormolekylet.

25 De katalytisk aktive molekyler er fortrinnsvis monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende monoklonale, antistoffkombinerende setedeler. Det antistoffkombinerende sete av disse molekyler immunreagerer (binder til) minst to ligandmolekyler. Et første ligandmolekyl er en reaktantligand som inneholder den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som hydrolyseres, så vel som en carbonholdig, kjemisk rest bundet til hver av carboxylsyre- og amin- eller alkoholdelene av bindingen som hydrolyseres.

30 En andre ligand er en hapteniske ligand anvendt direkte eller indirekte for å fremkalle de katalytiske molekyler. Den hapteniske ligand er strukturelt analog med reaktantliganden og inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe og til et mettet carbonatom ved en stilling i

den hapteniske ligand svarende til stillingen av carbonylgruppen og til det carbonylbundne heteroatom av det på forhånd valgte reaktantligand-carboxylsyreamid eller -ester som skal

5

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{---C---NH---} \end{array}$$

hydrolyseres. Når f.eks. en amid- (-C-NH-) eller ester-

10

(-C-O-)-binding skal hydrolyseres i reaktantliganden, inne-

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{---CH---CH}_2\text{---} \end{array}$$

holder den hapteniske ligand en -CH-CH₂-gruppe ved en stilling som er analog med den ester- eller amidbinding-holdige gruppe.

15

Carbonholdige, kjemiske rester bundet til det tetraedriske carbonatom og til det mettede carbonatom av haptenet, er strukturelt analoge (like) med de kjemiske rester bundet til carboxyldelen og amin- eller alkoholdelen av reaktantliganden.

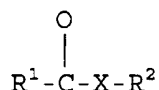
20

En haptenisk ligand inneholder også en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig løsning ved fysiologiske pH-verdier. Denne ioniske, ladningsbærende gruppe er fraværende fra en tilsvarende stilling av reaktantliganden og er lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7, og fortrinnsvis ca. 2 til ca. 5, Ångstrøm fra det ovenfor nevnte hydroxylgruppe-bundne, tetraedriske carbonatom. Den ioniske, ladningsbærende gruppe tilveiebringer fortrinnsvis et carboxylat eller ammoniumion i vandig løsning ved fysiologiske pH-verdier.

25

30

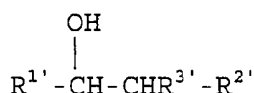
En reaktantligand kan være representert ved strukturen



35

hvor R^1 og R^2 betegner carbonatomholdige, kjemiske rester av reaktanten, og
 -X- er -O- eller -NR³-, hvor R^3 er hydrogen eller en tredje carbonholdig, kjemisk rest. En haptenisk ligand kan være representert ved strukturen

40



5 hvori R^{1'} og R^{2'} betegner carbonatomholdige rester som er
strukturelt analoge med R¹ og R². Minst én av R^{1'} og R^{2'}
inneholder en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig
løsning ved fysiologiske pH-verdier, og denne ionisk ladede
gruppe er lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en
10 radius på ca. 7,

og fortrinnsvis ca. 2 til 5 Ångstrøm fra $\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{-CH-} \end{array}$ gruppen av an-
gitte struktur. R^{3'} er H når -X- er -O-, eller R^{3'} er struk-
15 turelt analog med R³ når -X- er -NR³-.

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{-CH-} \end{array}$$

Celler som produserer de ovenfor diskuterte, katalyt-
iske molekyler når de dyrkes i et egnet in vivo eller in vitro
medium, tas også i betraktning. Disse celler produserer for-
trinnsvis ikke bare de katalytiske molekyler, men utskiller
20 også disse katalytiske molekyler i kulturmediet. Én slik fore-
trukket celletype er en hybridomcelle.

En metode for fremstilling av de ovenfor angitte
celler tas også i betraktning. Her immuniseres et dyr med et
immunogen som innbefatter en tidligere beskrevet haptenis-
25 ligand som er til stede i en mengde tilstrekkelig til å frem-
kalle antistoffer mot haptenet i dyret. Dyret opprettholdes i
et tidsrom tilstrekkelig til at dyret får utskille antistoffer
som immunreagerer med den hapteniske ligand.

Gener som koder for antistoffmolekyler eller mole-
30 kyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler, overføres
fra antistoffproduserende celler av det opprettholdte, immu-
niserte dyr i vertceller under dannelsen av hybridceller. Disse
hybridceller inneholder gener fra minst to kilder. Når de
dyrkes, produserer hybridcellene antistoffmolekyler eller
35 molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra de
overførte gener, og disse celler kan dyrkes hovedsakelig ube-
grenset sammenlignet med det gen som overfører antistoffpro-
duserende celler.

Hybridcellene dyrkes i et egnet medium og under eg-

nede dyrkningsbetingelser i et tidsrom tilstrekkelig til at disse hybridceller får produsere antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som gjenvinnes og deretter screenes for å identifisere en hybrid-

5 celle som produserer antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som katalytisk hydrolyserer den på forhånd bestemte carboxylsyreamid- eller esterbinding av reaktantliganden. Kloner av den identifiserte hybridcelle dyrkes deretter.

10 En metode for katalytisk hydrolyse av en på forhånd valgt ester- eller amidbinding i en reaktiv ligand tas også i betraktning. Her blandes en katalytisk effektiv mengde av de ovenfor diskuterte katalytiske molekyler med reaktantligandmolekyler i et vandig medium under dannelsen av en reaksjons-

15 blanding. Reaksjonsblandingen opprettholdes i et tidsrom tilstrekkelig til at reaktantligandmolekylene får bindes til de katalytiske molekyler og for at de katalytiske molekyler får hydrolysere den på forhånd valgte binding katalytisk og danne hydrolyseprodukter. Ett eller flere av de dannede produkter

20 kan deretter gjenvinnes.

Kort beskrivelse av tegningene

I tegningene som utgjør en del av foreliggende beskrivelse, illustrerer figur 1 i figurene 1A og 1B struktur-

25 formlene av spesifikke, hapteniske ligander (forbindelse 1a, 2, 5a, 6 og 7), en inhibitor (forbindelse 1b), substrat eller reaktantligand (forbindelse 3) og reaksjonsforbindelse 4 diskutert og anvendt her.

Figur 2 er en kurve som viser to pH- vs. log K-verdier. Den øvre del (fig. 2A) illustrerer en kurve av log

30 $k_{\text{app}}^{\text{kat}}$ vs. pH for log-verdier mellom -3 og -2 (fylte sirkler) for

reaksjonen av den monoklonalt antistoff 3OC6-katalyserte reaksjon av reaktantligandforbindelse 3. Linjen gjennom punktene

35 ble beregnet under anvendelse av ligningen

15

$$k_{\text{kat}}^{\text{app}} = (k_{\text{kat}}) \frac{K_a}{K_a + a_H}.$$

Den nedre del (figur 2B) viser en kurve av $\log k_{\text{obs}}^c$

5 vs. pH for log-verdier mellom -9,5 og -7,0 (fylte trekanten) for reaksjonen av forbindelse 3 ekstrapolert til nullbufferkonsentrasjon. Den beregnede linje ble erholdt under anvendelse av ligningen

10
$$K_{\text{obs}}^c = K_o + K_{\text{OH}} - [\text{OH}^-].$$

pH-verdier for begge kurver er mellom 5,5 og 8,5. Verdier for k_{kat} , K_a ($\text{p}K_a$), k_o og k_{OH} er tilveiebrakt i avsnittet Resultater i det etterfølgende.

15 Figur 3 er en kurve i to deler lik den i figur 2. Den øvre del (figur 3A) illustrerer en kurve av $\log k_{\text{kat}}^{\text{app}}$ vs. pH for

log-verdier mellom ca. -3 og ca. -1 (fylte sirkler) for reaksjonen av den monoklonalt antistoff 27A6-katalyserte reaksjon av reaktantligandforbindelse 3.

20 Den nedre del av figur 3 (figur 3B) viser kurver av $\log k_{\text{obsd}}$ (den observerte hastighetskonstant) vs. pH for log-verdier på ca. -8 til ca. -6 (fylte trekanten) for hydrolyse-reaksjonen for forbindelse 3 katalysert av monoklonalt antistoff 27A6. De fylte kvadrater vedrører $\log k_{\text{obsd}}$ vs. pH for
25 samme reaksjon ekstrapolert til nullbufferkonsentrasjon. Den beregnede linje ble erholdt under anvendelse av ligningen

$$k_{\text{obsd}} = k_{\text{OH}} - [\text{OH}^-].$$

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

30 I. Introduksjon

Foreliggende oppfinnelse angår antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler derav som angis kollektivt som reseptorer eller katalytiske molekyler som fremkalles av en haptensisk ligandanalogue i struktur med en reaktantligand. Den haptensiske ligand etterligner
35 strukturen sterisk, men ikke den ioniske ladning av en omvandlingstilstand i reaksjonssekvensen for hydrolysen av en ester eller en amidbinding av reaktantliganden. De katalytiske mole-

kyler [antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende anti-stoffkombinerende sete- (paratopiske) deler] binder til den hapteniske ligand og til reaktantliganden. De katalytiske molekyler er antatt å stabilisere den hydrolytiske omvand-
5 lingstilstand til en på forhånd valgt del av reaktantliganden, så vel som å tilveiebringe en ionisk ladet aminosyrerest som bidrar med syre-base- eller nukleofil katalyse til den katalyserte hydrolysereaksjon. Disse molekyler hydrolyserer reaktantliganden katalytisk.

10 Antistoffer og enzymer er begge proteiner hvis funksjon avhenger av deres evne til å binde spesifikke målmolekyler. Enzymatiske reaksjoner avviker fra immunologiske reaksjoner ved at i en enzymatisk reaksjon fører bindingen av enzymet til dets substrat typisk til kjemisk katalyse, mens et
15 ikke-katalytisk kompleks vanligvis er resultatet av antistoff-antigenbinding.

Enzymer er antatt å katalysere hydrolysen av proteiner ved kombinerings med proteinet for å stabilisere omvandlingstilstanden av hydrolysereaksjonen. Det er generelt antatt
20 at hastigheten av en enzymatisk reaksjon økes i forhold til hastigheten til en ikke-enzymatisk reaksjon på grunn av enzymets evne til å stabilisere omvandlingstilstanden av reaksjonen, dvs. å redusere den frie energi av omvandlingstilstanden, og således den frie aktiveringsenergi av reaksjonen
25 [Jencks, W.P., Adv. Enzymology, 43, 219 (1975) og Pauling, L., Amer. Scientist, 36, 58 (1948)]. Støtte for denne teori kommer fra den observasjon at substanser som er antatt å utforme de antatte omvandlingstilstander, ofte er sterkt bundet til enzymene som konkurrerende inhibitorer. Leinhard, G., Science,
30 180, 149 (1973) og Wolfenden, R., Acc. Chem. Res., 5, 10 (1972). Det er videre antatt at enzymet bevirker denne nedsettelse av den frie reaksjonsenergi ved binding av omvandlingstilstandsgeometrien av reaktanten sterkere enn det binder til de(t) tilsvarende substrat(er) eller produkt(er).

35 Dette betyr at den indre bindingsenergi av enzymet er meget større enn hva som kan måles fra bindingen av substrater eller produkter. Hovedsakelig utnytttes bindingsenergien av enzymet for å utføre den kjemiske reaksjon [Jencks, W.P., XVII

International Solvay Conference (november 1983)]].

Det motsatte prinsipp er at et antistoff som fremstilles for optimalt å binde en egnet etterligning av en omvandlingstilstand, vil virke som en katalysator. Demonstrasjonen av dette resultat avslutter korrelasjonen mellom enzymfunksjon og antistoffstruktur og tilveiebringer en anvendbar løsning på å konstruere kunstige enzymer.

Hovedidéen bak immunologisk hydrolyse beskrevet her, tar i betraktning anvendelse av en haptenisk ligand ved fremkallelse av antistoffer med på forhånd bestemt spesifisitet som (a) preferensielt binder til og derved stabiliserer omvandlingstilstanden av amid- eller esterbindingshydrolyse ved binding til den spesifiserte reaktantligand, og (b) sannsynligvis tilveiebringer en ionisk ladet syre-base eller nukleofil reaksjons-katalyserende aminosyrerest i det fremkalte, kombinerende sete. En haptenisk ligand som er anvendbar her, simulerer strukturen, men ikke den ioniske ladning av en høyenergi-omvandlingstilstand i amid- eller esterhydrolysen for å fremkalle produksjonen av antistoffer som har evne til å binde beslektede substrater (reaktantligander) og stabilisere deres hydrolyse. Den hapteniske ligand innbefatter også en gruppe som tilveiebringer en ionisk ladning i vandig løsning ved fysiologiske pH-verdier for å fremkalle en motsatt ladet aminosyrerest i det antistoffkombinerende sete. Denne motsatt ladede aminosyrerest er antatt å tilveiebringe den katalytiske effekt til syre-base- eller nukleofilreaksjonen.

Slik preferensiell binding og stabilisering resulterer i en reduksjon i aktiveringsenergien for hydrolysereaksjonen og oppfyller således et kriterium for katalyse. Nærvar av en ladet aminosyrerest i det kombinerende sete kan etterligne de ladede rester som er til stede ved de aktive seter av proteolytiske enzymer slik som serinproteasene. Antistoffer som utviser denne egenskap, kan erholdes ved immunisering med syntetiske haptener som er kjemisk modifisert for å fremkalle en ladet rest så vel som å etterligne bindingskarakteristikaene av en substrat-reaktantligand som gjennomgår bindingshydrolyse; dvs. ved immunisering med en sterisk etterligning av omvandlingstilstanden av den bestemte reaksjon.

Monoklonale antistoffer er blitt vist å katalysere et utall acyloverføringsreaksjoner [(a) Tramontano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6736 (1986); (b) Tramontano et al., Science, 234:1566 (1986); (c) Jacobs et al., J. Am. Chem. Soc., 109:2174 (1987); (d) Napper et al., Science, 237:1041 (1987); (e) Janda et al., Am. Chem. Soc., 110:4835 (1988); (f) Janda et al., Science, 241:1199 (1988); (g) Janda et al., Science, 244:437 (1989)], ved anvendelse av hapteniske omvandlingstilstandsmodeller [(Lerner et al., BioAssays, 9:107-122 (1988)].

For å utvide rammen og anleggene til disse hydrolytiske antistoffer eller reseptorer, også angitt som abzymer, må nye strategier utvikles for å fremkalle katalytisk aktivitet i de kombinerende seter av antistoffene. Nylige rapporter har rettet oppmerksomheten mot modifikasjonen av et antistoffs bindende lomme eller sete via enten semi-syntetiske metoder [(a) Pollack et al., Science, 242:1038 (1988), (b) Pollack et al., J. Am. Chem. Soc., 111:1929 (1989)] eller seterettet mutagenese [Baldwin et al., Science, 245:1104 (1989)]. Imidlertid kan generaliteten av slike strategier være redusert på grunn av mangel på tilgjengelige strukturelle data for katalytiske antistoffer.

Det ble antatt at en fremgangsmåte som kan fremkalle katalytisk aktive grupper de novo fra et haptensisk antigen, kunne vise seg å være mer fordelaktig fordi man kan utnytte den enorme variasjon av immunresponsen via den somatiske mutasjonsprosess, for å utføre "in vivo" mutagenese. Resultatene diskutert i det etterfølgende, gjengir en taktikk som fremkaller en aminosyrerest innen bindingssetet av det fremkalte antistoffmolekyl for å hjelpe til i enhver acyloverføringsreaksjon ved en metodologi som tidligere ble angitt som "lokke og dreie"-katalyse.

Planen her innbefattet anbringelse av en ionisk ladning innen antigenet eller den hapteniske ligandforbindelse 1a, (figur 1) i umiddelbar nærhet av den acylgruppe som skulle hydrolyseres. Antistoffene dannet mot dette haptens, er antatt å utvise aminosyrerester ved det kombinerende sete som har en ladning komplementær til denne hapteniske ladning [(a) Press-

man et al., J. Am. Chem. Soc., 68:250 (1946); (b) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 75:686 (1953); (c) Grossberg et al., J. Am. Chem. Soc., 82:5470 (1960); (d) Shokat et al., Nature (London), 338:269 (1989)].

5 I tillegg tilveiebringer forbindelse 1a til antistoffet en hydroxylisk gruppe som har en tetraedrisk geometri som tjener som en sterisk etterligning eller representasjon av acyloverførings-omvandlingstilstanden. Denne stilling ble holdt uladet slik at det ikke ville være noen ytterligere
10 elektrostatiske effekter.

Benzoatsubstratet eller reaktantligandforbindelsen 3 (figur 1) svarende til haptенforbindelse 1a, har lignende steriske dimensjoner (bestemt fra MM2-beregninger), men mangler den positive ladning. Således er den ionisk ladede aminosyrerest som er antatt å være ved det fremkalte, katalytiske
15 antistoffkombinerende sete, fri for ionepardannelse og tjener som en potensiell, generell syre-base- eller nukleofil katalysator.

Den pyridin-haptенiske ligandforbindelse 2 (figur 1) virker som en kontroll da den er strukturelt identisk med forbindelse 1a, men mangler metylgruppen og en ladning ved fysiologiske pH-verdier. Ladningskomplementaritet er tidligere blitt anvendt for å fjerne et substratproton i en antistoffkatalysert β -elimineringsreaksjon, selv om ingen sammenligning
20 ble foretatt med et nøytralt haptен. Shokat et al., Nature (London), 338:269 (1989).

Uttrykket "reseptor" er anvendt her for å angi et biologisk aktivt molekyl som binder til en reaktantligand, inhibitorligand eller haptенisk ligand. Reseptor- (katalytiske) molekylene ifølge oppfinnelsen er antistoffer, hovedsakelig intakte antistoffer eller idiotypeholdige polyamid-
30 (paratøpholdige) deler av et antistoff.

Biologisk aktivitet av et reseptormolekyl vises ved bindingen av reseptoren til dens antigeniske reaktantligand, inhibitorligand eller haptенiske ligand etter deres blanding i
35 et vandig medium, ved i det minste fysiologiske pH-verdier og ionestyrker. Fortrinnsvis binder reseptorene også til en antigenisk ligand innen et pH-verdiområde på ca. 5 til ca. 9, og

ved ionestyrker slik som den til destillert vann til den til ca. én molar natriumklorid.

Idiotypeholdige polyamiddeler (antistoffkombinerende seter eller paratoper) av antistoffer er de deler av anti-
5 stoffmolekyler som innbefatter idiotypen, og binder til reaktantliganden eller den hapteniske ligand. Slike deler innbefatter Fab-, Fab'- og F(ab')₂-fragmentene fremstilt fra antistoffer ved velkjente, enzymatiske spaltningssteknikker. Se f.eks. US patentskrift 4 342 566 tilhørende Theofilopoulos og
10 Dixon, generelt, og spesifikt, Pollack et al. [Science, 234, 1570 (1987)] som har angitt at akselererte, hydrolytiske hastigheter for Fab-fragmenter var de samme som de til nativ Ig. Ettersom antistoffene som idiotypeholdige polyamider erholdes fra er beskrevet som å være dannet mot eller fremkalt av
15 immunogener, er idiotypeholdige polyamidreseptorer angitt å være "dannet" eller "fremkalt" med den forståelse at et spaltningsstrinn typisk er nødvendig for å oppnå et idiotypeholdig polyamid fra et antistoff. Intakte antistoffer foretrekkes imidlertid og anvendes som eksempler på reseptormolekylene
20 ifølge oppfinnelsen.

Reseptorene (katalytiske molekyler) som er anvendbare ved foreliggende oppfinnelse, er fortrinnsvis monoklonale antistoffer eller deler derav. Et "monoklonalt antistoff" er en reseptor fremstilt av kloner av en enkel celle som produserer, og ofte utskiller, bare én type reseptormolekyl. Hybridomcellen er et eksempel på en slik celle og fusjoneres fra en antistoffproduserende celle og en myelomcelle eller annen selvbevarende cellelinje.

Teknikker for fremstilling av de monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen under anvendelse av hybridomteknikk, er velkjent. Slike reseptorer ble først beskrevet av Kohler og Milstein, Nature, 256, 495 (1975), som er inkorporert her ved referanse. Monoklonale antistoffer erholdes typisk fra hybridomvevskulturer eller fra ascitesvæske erholdt
30 fra pattedyr i hvilke hybridomvevet ble innført. Begge metoder er beskrevet her.

Monoklonale, katalytiske molekyler er foretrukne her på grunn av deres unike spesifisitet til å bindes til en be-

stemt epitop slik som en bestemt immuniserende, haptenisk ligand og en reaktantligand, så vel som deres relativt høyere spesifikke, katalytiske aktivitet sammenlignet med polyklonale antistoffer. Polyklonale antistoffpreparater kan også anvendes
5 her, men må typisk separeres i fraksjoner som binder til den immuniserende, haptenske ligand og de som binder til fremmede epitoper slik som de av den antigeniske bærer.

Polyklonale antistoffer som binder til den haptenske ligand, kan separeres ved affinitetsseparasjon under anvend-
10 else av en haptensk ligand som affinitetssorbant. Etter blanding og opprettholdelse av et antistoffpreparat med affinitetssorbanten i et tidsrom tilstrekkelig til at egnet immunreaksjon kan finne sted, separeres affinitetssorbanten fra den gjenværende del av antistoffpreparatet.

15 Den separerte, gjenværende antistoffdel bundet til affinitetssorbanten, inneholder antistoffene som binder til den haptenske ligand, mens antistoffer i den separerte, gjenværende del av antistoffpreparatet binder til fremmede epitoper. Disse affinitetsbundne antistoffer kan deretter isoleres ved vanlige teknikker for separering av bundne enheter
20 fra affinitetssorbanter, slik som vasking av sorbanten med glycin-hydroklorid ved pH 2.

En "ligand" er her definert som et molekyl eller kompleks som immunreagerer med eller binder til et reseptor-
25 molekyl-antistoffkombinerende sete. To prinsipale typer ligand tas her i betraktning. Et første er angitt som en haptensk ligand og anvendes som et immunogen for å fremkalle fremstilling av reseptormolekyler, som en inhibitor av den reseptormolekyl-katalyserte reaksjon og som et antigen i ELISA eller
30 andre bestemmelser. Den andre er angitt som reaktantligand eller substrat og er det molekyl som gjennomgår den katalyserte reaksjon. Den haptenske ligand er hovedsakelig inert når det gjelder å gjennomgå den katalyserte reaksjon.

Som beskrevet her, er kjemiske analoger av amid-
35 eller esterreaktantligander blitt syntetisert som haptener som inkorporerer et tetraedrisk carbonatom bundet direkte til en hydroxylgruppe og også direkte til et mettet carbonatom ved et spesifikt, på forhånd bestemt sete for å etterligne struk-

turen, men ikke den ioniske ladning av omvandlingstilstanden ved hydrolysen av en amid- eller esterbinding av en strukturelt lik eller analog reaktantligand.

Hydrolyse av amidbindingen av polypeptider eller proteiner krever hapteniske ligander som er hovedsakelig frie for hydrolyse når de anvendes som et haptenisk immunogen. Således er en haptenisk ligand som innbefatter det tetraedriske carbon, dets hydroxylgruppe og tilstøtende, direkte bundne, mettede carbonatom, frie for slik mulig hydrolyse.

Korte polypeptidkjeder kan fremkalle produksjon av antistoffer som gjenkjenner og binder til et homologt protein ved et på forhånd bestemt, spesifikt sete. Foreliggende oppfinnelse bringer det tidligere arbeide med polypeptider et vesentlig skritt fremover.

Her er antistoffene (reseptorer) fremkalt av et immuniserende, ioneladningsbærende, haptenisk første molekyl (den hapteniske ligand) og gjenkjenner og binder ikke bare til dette første molekyl, men også til et andre, beslektet molekyl (reaktantliganden) som er fritt for en ionisk ladning ved en analog stilling. Ved binding av dette andre molekyl forårsaker reseptoren hydrolyse (som her er vist å være katalytisk) av en på forhånd valgt ester eller amidbinding som tilsvarende i topologi topologien av det immuniserende, hapteniske første molekyl. Overensstemmelsen i topologi, dvs. størrelse og form, men ikke ionisk ladning, tilveiebringer et middel for forhåndsutvelgelse av setet ved hvilket hydrolyse av liganden finner sted. Inhibitorligander som etterligner strukturen av en hapteniske ligand eller en reaktantligand, bindes også av reseptormolekyler.

Ved syntese av en relativt liten, immuniserende, hapteniske ligand kan man følgelig fremkalle produksjon av reseptormolekyler som gjenkjenner, binder til og katalytisk spalter en ester- eller amidbinding i et annet molekyl som inneholder et flertall av amid- eller esterbindinger. Således kan reseptormolekyler fremstilles som katalytisk hydrolyserer en valgt, på forhånd bestemt amidbinding av et protein eller polypeptid slik som et genetisk konstruert fusjonsprotein, eller en esterbinding av en på forhånd valgt ester i en polyester.

Implikasjonen av dette resultat er at man kan skjeppe aktiviteten av hittil ukjente proteaser og esteraser til immunoglobuliner.

5 II. Omvandlingstilstand av esterolyse og haptensisk ligand-konstruksjon

Konstruksjon av den haptensisk ligand går bakover fra strukturen av de hydrolyseprodukter som skal dannes, gjennom omvandlingstilstanden for bindingsbrytningen som skal etter-
10 lignes, og deretter til den haptensiske ligand. Reaksjoner som innbefatter amid- eller esterhydrolyse, tilveiebringer illustrative eksempler på det generelle konsept og anvendes her som eksempler på en ester- eller amidhydrolysereaksjon.

Transacyleringsprosesser er karakterisert ved
15 carbonyladdisjons-elimineringsmekanismer. Acylgruppen kan derfor utvise varierende grader av tetraedrisk karakter i denne omvandlingstilstand. W.P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, kapittel 10, (McGraw-Hill, New York, 1969). Enzymene som katalyserer transacyleringsreaksjoner, kan forventes å binde godt de analoger av reaktantliganden som har en tetraedrisk konfigurasjon rundt acylsenteret. Dette er tilfelle for serinproteaser hvor en kovalent binding mellom liganden (substrat) og enzymet dannes temporært [Westerik et al., *J. Biol. Chem.*, 247, 8195 (1972); R.C. Thompson, *Biochemistry*, 12, 47 (1973) og Imperiali et al., *Biochemistry*, 25,
20 3760 (1986)], så vel som for enzymer som katalyserer den direkte hydrering av amider eller estere. Den sistnevnte kategori inhiberes av forbindelser med en tetraedrisk konfigurasjon innbefattende en fosfat-, fosfonat- eller fosfonamidatgruppe
25 istedenfor den spaltbare amidenhets [Weaver et al., *J. Mol. Biol.*, 114, 119 (1977) og Jacobsen et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 654 (1981)].
30

Hydrolysen av carboxylsyreestere er et enklere eksempel på transacylering som kommer nær opp til den haptensiske,
35 steriske etterligning av omvandlingstilstanden. Esterhydrolysereaksjoner forløper generelt ved egnede, spontane hastigheter under omgivende betingelser som er egnet for antistoffer. Derfor kan enhver liten hastighetsakselerering lett på-

vises.

En anvendbar haptenisk ligand inneholder et tetra-
edrisk carbonatom som er bundet til en hydroxylgruppe, så vel
som også er bundet direkte til et mettet carbonatom. Disse
5 atomer etterligner sterisk det tetraedriske carbonatom og
bundne oxygenatom eller nitrogenatom (heteroatom) av den
hydrolytiske omvandlingstilstand av en carboxylsyreester eller
amidbinding, men etterligner ikke den ioniske ladning av om-
vandlingstilstanden. Således er det tetraedriske carbonatom,
10 dets hydroxylgruppe og direkte bundne, mettede carbonatom ved
en stilling i den hapteniske ligand svarende til stillingen
til carbonylgruppen så vel som det carbonylbundne heteroatom
(oxygen eller nitrogen) av den på forhånd valgte carboxyl-
syreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres i reaktant-
15 liganden. Carbonatomholdige, kjemiske rester som er struk-
turelt analoge med carbonatomholdige rester av reaktantligan-
den, bindes til det tetraedriske carbonatom og til det mettede
carbonatom slik at de hapteniske ligander og reaktantligandene
er strukturelt like eller analoge bortsett fra ved atomene ved
20 hvilke hydrolysen finner sted.

Denne strukturelle, steriske etterligning av det
reaktive carbonyl- og oxygen- eller nitrogenatom avviker så-
ledes fra fosfonat- eller fosfonamidatgruppene eller carbonat-
gruppen anvendt av tidligere forskere som analog med den
25 hydrolytiske omvandlingstilstand. Foreliggende steriske etter-
ligning avviker også fra gruppene diskutert i Kim et al.-
patentet ved at strukturen i et foreliggende hapten inneholder
en lavere valens enn den analoge struktur i substratet og
inneholder samme antall bindinger, ikke én eller flere, som
30 den analoge struktur av substratet.

Et hapten som er anvendbart her, innbefatter enn
videre en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig løsning
ved fysiologiske pH-verdier. Denne ioniske, ladningsbærende
gruppe kan være bundet direkte til det ovenfor angitte, tetra-
35 edriske carbonatom. Fortrinnsvis er imidlertid den ioniske,
ladningsbærende gruppe indirekte bundet til det tetraedriske
carbonatom og er lokalisert innen et sfærisk volum definert
ved en radius på ca. 7 Ångstrøm (Å) fra det tetraedriske car-

bonatom. Fortrinnsvis er denne radius ca. 2 til ca. 5 Å.

Den ioniske, ladningsbærende gruppe er fraværende fra en tilsvarende stilling i reaktantliganden eller substratet og kan være valgt fra et utall velkjente grupper.

5 F.eks. innbefatter grupper som bærer en negativ ladning ved fysiologiske pH-verdier, for fremkallelse av en komplementær, positiv ladning i det antistoffkombinerende sete, carboxyl ($-\text{COH}_2$), fosfono [$-\text{P}(\text{OH})_2\text{O}$], sulfo ($-\text{SO}_3\text{H}$), fosforo [$-\text{OP}(\text{OH})\text{O}$], sulfato ($-\text{OSO}_3\text{H}$) og lignende. Eksempelvis grupper
10 som bærer en positiv ionisk ladning ved fysiologiske pH-verdier, for fremkallelse av en komplementær negativ ladning i det antistoffkombinerende sete, innbefatter amino ($-\text{NH}_2$), guanidin [$-\text{HNC}(\text{N})\text{NH}_2$], mono- og disubstituert amino hvor hver substituent inneholder opp til 10 carbonatomer slik som C_1 - C_6
15 lavere alkyl, benzyl, fenyl og nafthyl, eller hvor to substituenten danner en 5- eller 6-leddet ring slik som i morfolin-, piperidin-, pyrrolidin-, substituerte guanidinforbindelser med de ovenfor angitte substituenten, og kvaternære, nitrogenholdige grupper slik som trisubstituerte ammoniumforbindelser
20 slik som triethylammoniumgruppen eller en kvaternisert, aromatisk ring slik som en substituert kinolinium- eller pyridiniumring. Hver av de ovenfor nøytralt ladede grupper eksisterer som en negativt eller positivt ladet, ionisk gruppe i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier.

25 Carboxylgrupper og kvaternære aminer som finnes i heteroaromatiske ringer som tilveiebringer carboxylat- og ammoniumioner, er foretrukne. Kvaternære aminer, enten kvaternisert med fire substituentgrupper eller ved protonering, og enten tilstedeværende i acyklisk form eller i cyklisk form som
30 en del av en ring slik som i en N-methylpyridiniumrest, betraktes alle å høre til klassen av ammoniumgrupper når ioniske, ladningsbærende grupper diskuteres.

Der gruppen som bærer en ionisk ladning ved fysiologiske pH-verdier er en del av en annen gruppe som er bundet til
35 det ovenfor angitte, tetraedriske carbonatom, slik som i tilfelle av det kvaternære nitrogenatom av N-methylpyridiniumforbindelsen anvendt illustrativt her i forbindelse 1a, anses den ioniske, ladningsbærende gruppe å være det kvaternære nitro-

genatom av pyridiniumringen. Den ioniske, ladningsbærende gruppe i en slik struktur er således bundet indirekte til det tetraedriske carbonatom, og atomet av denne ioniske, ladningsbærende gruppe som bærer den ioniske ladning, dvs. et kvaternært nitrogenatom, er separert fra dette tetraedriske carbonatom med minst ett atom, fortrinnsvis et carbonatom. Et molekyl slik som et glycolsyrederivat, inneholder den ioniske gruppe bundet direkte til det tetraedriske carbonatom og dets hydroxylgruppe.

10 Reaktantliganden er strukturelt analog (lik) den hapteniske ligand og vice versa, men en reaktantligand er fri for den ovenfor diskuterte gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier som er lokalisert i en stilling strukturelt analog med lokaliseringen av
15 denne gruppe i den hapteniske ligand. Således inneholder den illustrative, hapteniske ligandforbindelse 1a N-methylpyridinium-kvaternært nitrogen, mens den illustrative substratligandforbindelse 3 inneholder en nøytralt ladet fenylring og dens carbon- og hydrogenatomer ved den tilsvarende stilling.

20 Den hapteniske ligand og/eller reaktantliganden (substrat) kan også innbefatte én eller flere ytterligere grupper som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier. Disse ioniske, ladningsbærende grupper kan være i tilsvarende eller ikke-tilsvarende lokaliseringer i de
25 to typer ligandmolekyler. I tillegg kan en slik ytterligere ionisk ladet gruppe eksistere innen det samme sfæriske volum definert for den ovenfor beskrevne, ioniske, ladningsbærende gruppe.

 Nærvær i den ene eller andre eller både den hapteniske ligand og reaktantliganden av én eller flere ionisk ladede grupper i tillegg til minst én slik ionisk ladet gruppe diskutert tidligere, kan også være anvendbar for å lette binding av et haptent til det kombinerende sete av katalysatormolekylet. Dette er særlig tilfelle hvor et relativt lite haptent slik som de som er illustrert her, anvendes.
35

Eksempelvis har studier med dextraner vist at maksimal binding av anti-dextran-antistoffer oppstår med dextraner inneholdende 6 eller 7 glucoserester. Studier med polyalanin-

oligomerer har vist maksimal binding ved en størrelse på 4 til 6 aminosyrerester. Chapman et al., Microbiology, 2. utg. kapittel 16, s. 444-447. Mindre oligomerer binder mindre godt, og hvor glucose ikke utviser noen binding.

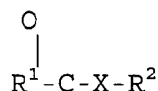
5 Ved således å tilveiebringe den ene eller begge ligander med én eller flere adderte, ioniske ladninger, kan dette medhjelp til binding av det katalytiske antistoffkombinerende sete i en ladningskomplementering så vel som ved strukturell tilpasning hvor en ligand er mindre enn den fulle
10 størrelse som kan rommes av bindingssetet.

Således inneholder den hapteniske ligand minst én gruppe som tilveiebringer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier slik som et amin, kvaternært nitrogenatom eller carboxylgruppe som tilveiebringer en ammoniumgruppe eller en carboxylatgruppe. Denne ladede gruppe er
15 innen det definerte, sfæriske volum og er fraværende fra en tilsvarende stilling i reaktantliganden.

Som allerede angitt, er det sfæriske volum innen hvilket minst den ene ioniske, ladningsbærende gruppe er
20 lokalisert i den hapteniske ligand, definert ved en radius på ca. 7 Å fra det tetraedriske carbonatom, og er mer fordelaktig innen et volum definert ved en radius på ca. 2 til 5 Å fra dette tetraedriske carbonatom. Slike sfæriske volumer og radier kan beregnes under anvendelse av dataprogrammer som er
25 velkjente innen faget eller ved anvendelse av molekylærmodeller.

Det skal forstås at anbringelse av den i det minste ene ioniske, ladningsbærende gruppe i den hapteniske ligand er slik at den presumptivt fremkalte komplementære, ladede aminosyrerest av det antistoffkombinerende sete, har adgang til
30 carbonylgruppen og dens bundne oxygen- eller nitrogenatomer av esteren eller amidet som skal hydrolyseres. Sagt på en annen måte, er den ioniske, ladningsbærende gruppe av den hapteniske ligand ikke sterisk hindret fra det tetraedriske carbonatom, dets hydroxylgruppe og tilstøtende, mettede carbonatom.
35

En anvendbar reaktantligand er representert ved strukturen

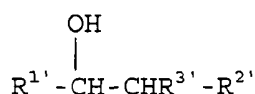


hvor R^1 og R^2 representerer carbonatomholdige, kjemiske
 5 rester, og $-\text{X}-$ er $-\text{O}-$ eller $-\text{NR}^3$, hvor R^3 er hydrogen eller en
 tredje carbonholdig, kjemisk rest.

R^1 og R^2 kan være like eller forskjellige. Hver
 gruppe kan være en aminosyrerest, et polypeptid eller protein,
 så vel som et organisk radikal slik som en alifatisk eller
 10 substituert alifatisk, rettkjedet eller forgrenet, åpenkjedet
 eller cyklisk rest, innbefattende en cyklisk eller åpenkjedet
 heteroatomholdig rest, og kan også være en aromatisk, substi-
 tuert aromatisk, heteroaromatisk eller substituert hetero-
 aromatisk rest. Så lenge som reaktantliganden kan oppløses i
 15 et vandig medium som ikke vesentlig inhiberer virkningen av
 katalysatormolekylet og er stort nok til å bindes av katalysa-
 toren, kan de spesifikke strukturer av R^1 og R^2 være hoved-
 sakelig hvilke som helst carbonholdige, kjemiske rester.

Når den er forskjellig fra hydrogen (H), kan R^3 også
 20 være hovedsakelig en hvilken som helst carbonholdig, kjemisk
 rest, slik som tilfellet med R^1 og R^2 .

En haptensk ligand er strukturelt analog (lik) med
 reaktantliganden. En haptensk ligand er representert ved
 25 strukturen



30 hvor R^1 og R^2 betegner carbonatomholdige rester som er
 strukturelt analoge (like) med henholdsvis R^1 og R^2 , og R^3 er
 strukturelt analog (lik) med R^3 når $-\text{X}-$ er $-\text{NR}^3$. Når $-\text{X}-$ er $-\text{O}-$,
 er R^3 hydrogen. Minst én av R^1 og R^2 tilveiebringer også
 den gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved
 35 fysiologiske pH-verdier som er fraværende i reaktantliganden,
 og denne gruppe er innen det tidligere diskuterte, sfæriske
 volum.

I foretrukket praksis er medlemmene av R-gruppeparene
 R^1 og R^1 , R^2 og R^2 , R^3 og R^3 så strukturelt analoge at R^1 og

R^1 er hovedsakelig identiske, R^2 og $R^{2'}$ er hovedsakelig identiske og R^3 og $R^{3'}$ er hovedsakelig identiske, bortsett fra når -X- er -O-. I denne foretrukne situasjon er forskjellene mellom de likt nummererte par av R-grupper slik at den

5 hapteniske ligand inneholder den ioniske, ladningsbærende gruppe som ikke er til stede i reaktantliganden, og den hapteniske ligand innbefatter også et atom eller gruppe som anvendes for å kjede den hapteniske ligand til et antigenisk (immunogenisk) bærer-molekyl under dannelsen av et immunogenisk
10 konjugat som diskutert i det etterfølgende.

Bortsett fra de ovenfor angitte forskjeller er således de likt nummererte, parede grupper fortrinnsvis av samme størrelse, form, ladning og grad av umettethet. Hvor størrelsen av de likt nummererte, parede R-grupper avviker, foretrekkes
15 det at den hapteniske ligand har større størrelse enn reaktantliganden slik at den mindre reaktantligand kan rommes innen det fremkalte, katalytiske bindingssete.

Strukturene av de illustrative, hapteniske ligander og reaktantligander anvendt for denne undersøkelse, ble valgt
20 i henhold til visse kriterier. Disse innbefattet tilgjengelighet og stabilitet av de tetraedriske, carbonatomholdige forløpere, det tilsvarende carboxylsyreamid- eller estersubstrat, egnetheten av den kjemiske syntese for dens fremstilling og tilpasningsevnen til forskjellige skjemaer for immunologisk
25 presentasjon. Ved innbefattelse av aminosubstituenten i de aromatiske ringer kan f.eks. enten den benzylliske eller fenoliske gruppe tilveiebringes med et funksjonelt vedheng for kobling til immunogeniske bærerproteiner for hapteniske presentasjon.

30

III. Katalytiske, antistoffproduserende celler og metoder

Celler som når de dyrkes i et egnet medium produserer monoklonale katalysatormolekyler (antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler) som
35 katalytisk hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand, tas også i betraktning her. Disse celler utskiller fortrinnsvis også de ovenfor angitte molekyler i deres kulturmediummiljø, enten dette kul-

turmediummiljø er in vitro eller in vivo. I en foretrukket utførelsesform er disse celler hybridomceller slik som hybridom 3OC6.

Generelt fremstilles slike katalysatormolekyl-
5 produserende celler ved immunisering av et laboratoriedyr slik som en mus, rotte, geit eller hest med et immunogen som inneholder en antistoffremkallende mengde av en tidligere beskrevet, hapteniske ligand. Typisk er immunogenet et konjugat av den hapteniske ligand og en antigenisk (immunogenisk) bærer,
10 som diskutert i det etterfølgende.

Det således immuniserte dyr bevares i et tidsrom tilstrekkelig til at dyret får utskille antistoffer som immunreagerer med den hapteniske ligand. ELISA-bestemmelsen diskutert i det etterfølgende, er anvendbar for å bestemme nærvær
15 av en krevet immunreaksjon.

Gener som koder for antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler derav fra antistoffproduserende celler av det ovenfor bevarte dyr, slik som splenocytter, overføres til vertceller. Denne genover-
20 føring danner hybridceller som inneholder gener fra minst to kilder. Hybridcellene produserer antistoffmolekylene eller antistoffkombinerende setedeler fra de overførte gener når de dyrkes på riktig måte, og kan dyrkes hovedsakelig ubegrenset, i forhold til de antistoffproduserende celler fra hvilke genet
25 er blitt overført. Eksempelvis celler som kan dyrkes hovedsakelig ubegrenset i forhold til de genoverførende celler, innbefatter hybridomceller, E. coli-celler, gjærceller slik som S. cerevisiae, transformerte pattedyrceller slik som CHO-celler og lignende.

30 De således fremstilte hybridceller dyrkes i et egnet kulturmedium, f.eks. in vivo eller in vitro, i et tidsrom tilstrekkelig til at disse dyrkede hybridceller får produsere antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler derav, hvilke molekyler deretter gjenvinnes. Eksempler på in vivo og in vitro kulturbetingelser for
35 hybridomceller er diskutert her og er velkjente, slik som dyrkningsbetingelser for celler slik som E. coli, S. cerevisiae, CHO og lignende.

De gjenvundne molekyler screenes deretter for å identifisere en hybridcelle som produserer molekyler som katalytisk hydrolyserer den på forhånd bestemte carboxylsyreamid- eller esterbinding av reaktantliganden. Så snart en slik

5 hybridcelle er blitt identifisert, dyrkes flere kloner av denne hybridcelle.

Den ovenfor angitte fremgangsmåte omfatter hybridomfremstilling, en metode velkjent innen faget, og denne er diskutert i detalj her. Det er også kjent innen faget at gener

10 som koder hovedsakelig bare for den antistoffkombinerende setedel av et antistoffmolekyl, kan overføres fra en pattedyr-celle til en annen, og den ovenfor beskrevne prosess er også beregnet på å innbefatte slike prosesser. Den ovenfor beskrevne prosess er også beregnet på å omfatte metoden ifølge

15 Shastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728 (1989) og Huse et al., Science, 246:1275 (1989), hvis beskrivelser er inkorporert her ved referanse, hvori molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler, produseres i ikke-pattedyr-organismer slik som E. coli ved anvendelse av genetiske konstruksjonsteknikker. De overførte gener i disse publikasjoner var et resultat av anvendelse av mRNA fra hybridomer eller miltene til immuniserte dyr for å fremstille gener som koder for V_H- eller Fab-antistoffdeler som ble uttrykt i E. coli-celler.

25 I et annet metodeaspekt ved foreliggende oppfinnelse blandes en katalytisk mengde av de monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler derav (katalytiske molekyler) produsert av slike celler, med reaktantligandmolekyler i et vandig medium under dannelsen

30 av en reaksjonsblanding. Den således dannede reaksjonsblanding opprettholdes i et tidsrom tilstrekkelig til at reaktantligandmolekylene får binde til de katalytiske molekyler, og til at de katalytiske molekyler får hydrolysere den på forhånd valgte binding katalytisk. Et produkt av hydrolysereaksjonen

35 kan, om ønsket, gjenvinnes.

Denne hydrolytiske metode ifølge oppfinnelsen anvender et vandig medium som en del av reaksjonsblandingen. Dette medium inneholder typisk vann og buffersalter. I tillegg

kan mediet inneholde andre salter slik som natriumklorid, så vel som vannløselige kalsium- og magnesiumsalter som hyppig finnes i proteinholdige medier. Organiske løsningsmidler slik som metanol, ethanol, acetonitril, dimethylsulfoxyd, dioxan, 5 hexamethylfosforamid og N,N-dimethylformamid, kan også være til stede. Overflateaktive midler som emulgerer reaktantliganden og reseptormolekylet, kan også være til stede. Det kritiske trekk ved bestanddelene som er til stede i det vandige medium, er at disse bestanddeler ikke interfererer vesentlig 10 med eller inhiberer den katalytiske reaksjon slik som ved denaturering av det katalytiske molekyl. I tillegg er det vandige medium hovedsakelig fritt for salt, proteiner generelt og enzymer spesifikt, som inhiberer den bindingsoppbrytende reaksjon katalysert av det katalytiske molekyl.

15 Det vandige medium har typisk en pH-verdi på ca. 5 til ca. 9, og fortrinnsvis ca. pH 6,0 til 8,0. pH-verdier større og mindre enn disse angitté verdier kan også anvendes så lenge som den katalyserte reaksjon igjen ikke interfereres eller inhiberes vesentlig.

20 De katalytiske reaksjoner utføres typisk ved omgivende romtemperatur, dvs. ved ca. 20 til ca. 25°C, eller ved 37°C, og ved omgivende atmosfæretrykk, dvs. ved ca. én atmosfære. Imidlertid kan temperaturer ned til ca. frysepunktet for det vandige medium og opp til ca. kokepunktet for mediet ved 25 atmosfæretrykk også anvendes. Som kjent, er proteiner slik som de foreliggende, katalytiske molekyler, tilbøyelige til å denaturere ved forhøyede temperaturer slik som de ved hvilke et vandig medium koker, f.eks. ved ca. 100°C, og temperaturer under ca. 40°C er således foretrukne.

30 Reaktantliganden er til stede i en reaksjonsblanding i en mengde opp til dens løselighet i det vandige medium. Et tofasesystem som innbefatter uløselig reaktantligand, kan også anvendes, men anvendes normalt ikke. Normalt anvendte konsentrasjoner av reaktantliganden er ca. 0,1 mikromolar (μM) til 35 ca. 10 millimolar (mM), og hvor denne mengde også er en funksjon av løseligheten av reaktantliganden i det vandige medium. Hvor produktet er ønsket per se, anvendes relativt høyere konsentrasjoner sammenlignet med lavere konsentrasjoner hvor en

reaksjonsmekanisme eller reaksjonskinetikk skal studeres.

En katalytisk effektiv mengde av de katalytiske molekyler er også til stede. Således anvendes de katalytiske molekyler typisk i et molarforhold til reaktantliganden på ca. 1:2 til ca. 1:10.000, hvor et molarforhold på ca. 1:10 til ca. 1:100 er foretrukket.

Forholdet mellom katalytiske molekyler og reaktantligand avhenger typisk av den spesifikke aktivitet av de katalytiske molekyler mot reaktantliganden og formålet for brukeren ved utførelse av reaksjonen. Hvor således produktet er ønsket, anvendes en relativt høyere konsentrasjon av katalytiske molekyler, og et høyere forhold mellom katalytiske molekyler og reaktantligand. Hvor reaksjonsmekanismen eller kinetikken ved reaksjonen skal studeres, anvendes typisk en lavere konsentrasjon og forhold. En støkiometrisk mengde av katalytiske molekyler eller mindre kan også anvendes, men da katalytiske molekyler anvendes, kan anvendelse av til og med en støkiometrisk mengde være uøkonomisk.

Varigheten av reaksjonsoppholdstidsperioden er en funksjon av flere parametere innbefattende de katalytiske molekyler og valgte reaktantligand, deres konsentrasjons-pH-verdi og -temperatur, så vel som hva som etterstrebes fra reaksjonen. Hvor kinetikkstudier skal utføres, støter man ofte på oppholdstider på minutter til timer. Hvor reaksjonsprodukter er ønsket, er oppholdstider på timer til dager mer vanlig.

IV. Resultater

Hapteniske ligandforbindelser 1a og 2 ble syntetisert i henholdsvis fem og fire trinn ved å starte fra 4-nitrofenethylbromid som beskrevet i det etterfølgende. [Alle nye forbindelser utviste tilfredsstillende spektroskopisk (NMR, IR) og forbrenningsanalyse ($\pm 0,3\%$)]. Begge hapteniske ligandforbindelser 1a og 2 ble koblet (via N-hydroxysuccinimidesteren) til bærerproteinene kvegserumalbumin (BSA) og albuskjellhemocyanin (KLH) under dannelselse av immunogene konjugater. 129G1X⁺-mus ble immunisert med KLH-konjugatet av forbindelse 1a og 2, og antistoffer ble dannet og screenet som beskrevet her. [(a) Kohler et al., Nature (London), 256:495

(1975); (b) Enguall, Method Enzymol., 70:419 (1980)].

Immunisering med haptenisk ligand 1a produserte 23 hybridomer, mens haptenisk ligandforbindelse 2 ga 21 hybridomer som bandt til de respektive haptener. Alle monoklonale antistoffer var av IgG-klassen og ble renset fra ascitesvæske ved anionbytterkromatografi etterfulgt av affinitetskromatografi på en protein G-kolonne. Antistoffer ble bedømt til å være homogene med natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektroforese.

Monoklonale antistoffer ved en konsentrasjon på 20 µM ble først screenet (fosfatbuffer 50 mM, pH 7,5, 100 mM NaCl, 37°C) mot benzoatesterreaktantligandforbindelse 3, (500 µM) for produksjon av 5-[[4-(hydroxy)fenyl]amino]-5-oxopentansyre, forbindelse 4. [Analyse ble utført via HPLC på en RP-C18-kolonne eluert med vann: acetonitril (op:10) til en strømming på 1 ml/min. med UV-detektor innstilt på 254 nm. Hydrolyseproduktet, forbindelse 4 (figur 1; retensjonstid 7 minutter) ble oppsamlet (gjenvunnet) og funnet å være identisk ved RP-HPLC-koinjeksjon og massespektralanalyse med en autentisk prøve].

Fra de tjuetre monoklonale antistoffer erholdt mot haptenisk ligandforbindelse 1a, ble syv funnet å være katalytiske. Ingen av antistoffene mot haptenisk ligandforbindelse 2 utviste noen tendens til å akselerere hydrolysehastigheten av reaktantligandesteren, forbindelse 3.

De syv antistoffer som ble funnet å være katalytiske, ble fullstendig inhibert ved tilsetning av fri haptenforbindelse 1b. Slike resultater antyder at katalyse etterfølger binding av substratet i den antistoffbindende lomme eller kombinerende sete.

Mest signifikant var det overveldende antall katalytiske antistoffer fremkalt av haptenisk ligandforbindelse 1a vs. forbindelse 2. Ett av disse syv katalytiske antistoffer betegnet hybridom og monoklonalt antistoff 30C6, ble karakterisert i detalj.

Den første hydrolysehastighet av substrat- eller reaktantligandforbindelse 3 (50 mM fosfat, 100 mM NaCl, pH 7,2, 37°C) katalysert av monoklonalt antistoff 30C6 (20 µM), fulgte Michaelis-Menten-kinetikken [konsentrasjoner av hydro-

lyseproduktforbindelse 4 ble bestemt ved HPLC-målinger av dets topphøyde i forhold til den til en indre standard i løpet av 1-2 timer (3 eller flere bestemmelse)] . En standardkurve viste linearitet med konsentrasjoner av hydrolyseproduktforbindelse 4 opp til 0,5 mM) med verdier for $k_{\text{kat}}^{\text{app}}$ og K_m på $5 \pm$

$0,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ og $1,12 \pm 0,05 \text{ mM}$. Den antistoffkatalyserte hydrolyse av benzoatreaktantligandforbindelse 3 ble konkurrerende inhibert ved tilsetning av

pyridiniumsaltforbindelse 1b.

pH-avhengigheten av hydrolysen av substratforbindelse 3 ble undersøkt i nærvær av monoklonale antistoffer 30C6 (20 μM) mellom pH 6,0 og 7,2 (Bis-tris) og 7,2-8,0 (fosfat), begge til 50 mM buffer og 100 mM NaCl, 37°C (figur 2). pH-avhengigheten av $k_{\text{kat}}^{\text{app}}$ røper deltagelse av den basiske form av en dis-

sosierbar gruppe hvis pK_a ble bestemt å være $6,26 \pm 0,05$ (figur

2A). Variasjon av bufferionkonsentrasjonen (12,5-50 mM) viste ingen avhengighet av k_{kat} av nærvær av bufferarter.

For direkte sammenligning ble hydrolysehastighetene (k^{obs}) av reaktantligandforbindelse 3 over den identiske pH-region ekstrapolert til null-bufferkonsentrasjon (figur 2B)

også målt. pH versus hastighetsprofilen innebar at artene (Bruice et al., Bioorganic Chemistry; Benjamin: New York, 1965; vol. 1) involvert i spaltningen, var vann i pH-regionen på 6,0 til 6,5 ($k_o = 0,6 \times 10^{-9} \text{ min}^{-1}$) og hydroxyd fra pH 6,6 og oppover ($k_{\text{OH}^-} = 4,2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

Forholdet k_{kat}/k_o , en sammenligning mellom den pH-uavhengige, antistoffkatalyserte hydrolysehastighet av substratforbindelse 3 og denne hydrolyse i vann, svarer til en hastighetsakselerasjon av antistoffet på over en million ganger. Signifikant var pH-optimumet av den antistoffkatalyserte reaksjon blitt beveget inn i den nøytrale pH-region ved deltagelse av en hittil ikke identifisert aminosyrerest som sannsynligvis er negativt ladet.

Haptenforbindelser 5a og 6 ble syntetisert ved å

starte med 4-nitrofenethylbromid som diskutert i det etterfølgende. Dimethylaniliniumantigenforbindelse 7 ble fremstilt ved å starte med 4-aminobenzylalkohol som også diskutert senere. Konjugat av forbindelse 5a, 6 og 7 produserte henholdsvis 18, 22 og 26 hybridomer hvor alle disse monoklonale reseptor-molekyler var av IgG-klassen.

Antistoffer ved en konsentrasjon på 20 μM ble først screenet (fosfatbuffer, 50 mM, pH 7,5, 100 mM NaCl, 37°C) via en HPLC-bestemmelse mot benzoatesterforbindelse 3, (500 μM) for produksjon av 5-[(4-hydroxyfenyl)amino]-5-oxopentansyre, forbindelse 4. Fra de 18 monoklonale antistoffer erholdt mot forbindelse 5a, ble tre funnet å være katalytiske. De 22 og 26 antistoffer erholdt fra immuniseringer med haptensorbindelser 6 og 7, utviste en neglisjerbar eller en inhiberende effekt på den spontane hydrolysehastighet av forbindelse 3. De tre antistoffer som ble funnet å være katalytiske, ble fullstendig inhibert av nærværet av 50 μM av carboxylatforbindelse 5b.

Kinetikken for det mest effektive katalytiske antistoff, den monoklonale reseptor utskilt av hybridom 27A6 erholdt fra immuniseringer med haptensorbindelse 5a, ble karakterisert i detalj. Denne monoklonale reseptor er også angitt som reseptor eller antistoff 27A6. Den opprinnelige hydrolysehastighet av forbindelse 3 [50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinpropansulfonsyre (EPPS), 100 mM NaCl, pH 8,5, 37°C] katalysert av reseptor 27A6, fulgte Michaelis-Menten-kinetikken med verdier for K^{app} og K_m på $0,01 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ og $(243 \pm$
kat

15) $\times 10^{-6} \text{ M}$. Den antistoffkatalyserte hydrolyse av benzoatforbindelse 3 ble konkurrerende inhibert ($K_i = 6 \pm 2 \text{ } \mu\text{M}$) ved tilsetning av carboxylatforbindelse 5b.

pH-avhengigheten av hydrolysen av forbindelse 3 ble undersøkt i nærvær av monoklonal reseptor 27A6 (20 μM) mellom pH 7,2-8,4 (EPPS) og pH-verdier 8,4 og 10,0 [2-(cyclohexylamino)ethansulfonsyre (CHES)], både 50 mM buffer og 100 μM NaCl, ved 37°C (figur 3). pH-avhengigheten av $\log K^{\text{app}}$ (figur
kat

3A) var lineær i denne region, slik som bakgrunnshastigheten av hydrolysen ($\log K_{\text{obsd}}$; figur 3B, fylte trekanter) og hydro-

lysehastigheten for forbindelse 3 ekstrapolert til null-bu-
ferkonsentrasjon ($K_{OH^-} = 2,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) (figur 3B, fylte kva-
drater). Variasjonen av bufferkonsentrasjonen (12,5-50 mM) i
nærvær av monoklonal reseptor 27A6 indikerte ingen avhengighet
5 av K_{kat}^{app} på konsentrasjonen av bufferarter. Det var ingen for-

skjell i de observerte hastigheter med monoklonal reseptor
27A6 når de ble utprøvet ved pH 8,6 i EPPS og CHES (50 mM buf-
fer, 100 mM NaCl).

10 Den esterolytiske aktivitet av monoklonal reseptor
27A6 var upåvirket ved behandling med diethylpyrocarbonat
eller maleinsyreanhydrid i 50-dobbelt molart overskudd til
protein. Lignende behandling med fenylglyoxal resulterte i 75%
tap av katalytisk aktivitet. Dette samme antistoffpreparat
15 utviste også et firedobbelt fall i titer (binding til haptен-
forbindelse 5b) som observert ved ELISA. Identisk behandling
av proteinet i nærvær av inhibitorforbindelse 5b (femdobbelt
molart overskudd til protein) resulterte i bare 35% tap av
katalytisk aktivitet og ingen merkbar forandring i titer.

20 På grunn av disse observasjoner ble andre katalytiske
og ikke-katalytiske antistoffer mot haptенforbindelser 5a, 6
og 7 kjemisk modifisert med fenylglyoxal på nøyaktig samme
måte som beskrevet ovenfor. Antistoffer mot forbindelse 6
(2G4, 4E3, 6H4, 6A11) og 7 (52D11, 57G12, 70F3, 5G3, 60A4) var
25 upåvirket (ELISA). Derimot utviste fem antistoffer fremkalt
under anvendelse av forbindelse 5a (57G11, 60A4, 52D11 og
5G3), alle samme tap av binding (ELISA). De katalytiske anti-
stoffer 57G11 og 70F3 utviste en firedobbelt reduksjon i
titer, og antistoffene 60A4, 52D11 og 5G3 utviste en tre-, to-
30 og en-ganger reduksjon i titer.

Den tidligere diskuterte strategi basert på anvend-
else av antistoffer som ble fremkalt fra en homolog serie av
haptener (figur 1) som hver utviste en punktladning i umiddel-
bar nærhet med, eller i direkte substitusjon for, den kjemiske
35 gruppe (ester eller amid) som skulle omdannes i det respektive
substrat (figur 1), har vist seg å være effektiv. Det ble an-
tatt at antistoffer dannet mot disse haptener, skulle utvise
aminosyrerester ved det antistoffkombinerende eller bindende

sete med en ladning komplementær til den hapteniske ladning. Substratesterforbindelse 3 mangler denne ladning, men bibe- holder en helt lik struktur. Etter binding av forbindelse 3 er således aminosyreresten(e) ved bindingssetet fri for sin
5 opprinnelige ladningsstabiliserende rolle og kan nå tjene som et potensielt, generelt syre/base- eller et omvandlingstil- standsstabiliserende element.

Selv om antistoff-haptenladningskomplementaritet ble antatt å være essensiell for den fulle vellykkethet av pro-
10 sjektet, ble to andre områder vedrørende haptenutforming an- tatt å være viktige. Den første var erstatning av acylfunk- sjonaliteten som skulle hydrolyseres, mens den andre nødven- diggjorde anvendelse av uladete haptener.

Det første punkt ble tatt fatt på ved anvendelse av
15 en egnet acylgruppeisoster. En hydroxylisk gruppe som har en tetraedrisk geometri som tjente som en adekvat representasjon på den utviklende omvandlingstilstand, ble anvendt. Denne stilling ble med hensikt gjort uladet slik at det ikke ville være noen ytterligere elektrostatiske effekter. Imidlertid kan
20 det forutses at "andre generasjons haptener" kan innbefatte en ladet fosforgruppe ved denne stilling som beskrevet i US patentskrift nr. 4 629 567 og publisert Europapatentsøknad nr. O 260 439A2. De uladete haptener [dvs. forbindelsene 2 og 6 (figur 1)] var nødvendige som kontroller for å sikre riktig-
25 heten av hypotesen da disse virkelig er strukturelt identiske med forbindelsene 1 og 5, men uten ladning.

De ovenfor angitte resultater viste at "lokke og dreie"-strategien som katalyserer acyloverføringsreaksjoner, er anvendbare når N-methylpyridiniumsaltforbindelsen 1a ble
30 anvendt for antistofffremkalling. Med dette hapten var 30% av de erholdte, monoklonale antistoffer katalytiske. Selv om dette antall var imponerende, var den observasjon mer interes- sant at én av disse reseptorer anvendte deltagelse av en bas- isk form av en ioniserbar gruppe ($pK_a = 6,26 \pm 0,05$) i den
35 katalytiske prosess. I tillegg var pH-optimumet for den anti- stoffkatalyserte reaksjon nær nøytralitet, og anvendelse av nøytral haptenforbindelse 2 utviste ingen tilbøyelighet til å fremkalle katalytiske antistoffer.

Haptenforbindelse 7 ble fremstilt som diskutert i det etterfølgende. Det mest merkbare trekk ved dette molekyl er den tetraedriske, kationiske ladning som direkte erstatter acylcarbonet av substratet. Selv om dette hapten kan betraktes
5 som et mer radikalt avvik fra de typiske fosfonathapten-surrogater ifølge faget, kan det rette oppmerksomheten mot et utall tidligere ubesvarte spørsmål angående "lokke og dreie"-strategien. To av betydning er viktigheten av den kationiske ladning innbefattende dens plassering i forhold til den spaltbare binding av substratet og relevansen av foreliggende acyl-carbonerstatning med hydroxyisosteren.
10

Fra de 26 antistoffer dannet mot haptenforbindelse 7, ble ingen funnet å akselerere hydrolysehastigheten i merkbar grad over bakgrunnshastigheten. Dette resultat var ganske
15 interessant i lys av det faktum at et lignende antigen utformet av Schultz-forskergruppen utviste en stor tilbøyelighet (66%) til å fremkalle katalytiske antistoffer for en elimineringsreaksjon [Shokat et al., Nature (London), 338:269 (1989)]. Selv om reaksjonene her er fullstendig forskjellige, fant
20 Schultz-gruppen overbevisende bevis for at et carboxylat var involvert i den katalytiske prosess slik som det ble funnet under anvendelse av metilpyridiniumhaptenforbindelsen 1 for å fremkalle antistoffer for en esterolytisk reaksjon. Disse resultater forbundet med observasjonene for antistoffer erholdt
25 mot haptenforbindelser 1a og 2, antyder følgende: (1) hastighetsøkningene som ses med monoklonale reseptorer fremkalt fra haptenforbindelse 1a, skyldes ikke bare nærvær av et carboxylat som virker som en katalytisk base. (2) Funksjonaliteten i haptenet som anvendes for å representere omvandlingstilstanden, er kritisk. (3) Kombinasjonen av en kationisk ladning og
30 minst en nøytral representasjon av omvandlingstilstanden, er nødvendig for å fremkalle hydrolytiske reseptormolekyler.

En total prosess lik den oppnådd under anvendelse av kationisk haptenforbindelse 1a, ble frembrakt under anvendelse
35 av et strukturelt lignende anionisk hapten. Benzosyrehaptenforbindelse 5a oppfylte de nødvendige krav. Ryggraden av forbindelse 5a var homolog med haptenforbindelser 1a og 2, mens den utviste et anionisk ladningspunkt i umiddelbar nærhet til

den acylgruppe man planla å hydrolysere. Valget av en carboxylatgruppe var basert på observasjonene foretatt av Pressman som indikerte at denne type funksjonalitet innen et haptenisk molekyl har en sterk tilbøyelighet til å fremkalle en positivt ladet aminosyre (dvs. lysin eller arginin) innen den anti-stoffbindende lomme [(a) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 68:250 (1946); (b) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 75:686 (1953); (c) Grossberg et al., J. Am. Chem. Soc., 82:5470 (1960)]. Det ble antatt at enhver aminosyrerestsiddekjede kunne hjelpe til i den katalytiske prosess via generell syre- eller elektrostatisk stabilisering av en omvandlingstilstand. Den sistnevnte prosess innbefattende argininrester, er blitt involvert i enzymkatalyse [(a) Riordan et al., Science, (Washington, D.C.) 195:884 (1977); (b) Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76:2551 (1979); (c) Springs et al., Tet. Lett., 32:3223 (1977)].

Hydroxyethylbenzozsyreforbindelsen 5b ble syntetisert. Forbindelsen ble utstyrt med N-hydroxysuccinimidester slik som forbindelse 5a for enkel kobling til proteinbæreren. Immuniseringer til forbindelse 5a-KLH-konjugatet frembrakte atten monoklonale antistoffer hvor tre av disse var katalytiske, og hvis katalyse ble inhibert av fri haptenforbindelse 5b. Selv om antallet katalytiske reseptorer fremkalt av forbindelse 5a ikke var så stort som med forbindelse 1a, var det gledelig å finne at ingen av de tjueto monoklonale antistoffer fremkalt av den nøytrale homolog (forbindelse 6) av forbindelse 1a og 5a, var katalytiske. Igjen kan betydningen av den ladede funksjonalitet inneholdt innen antigenkonstruksjonen, ses.

Observasjoner av pH-hastighetsprofilen av monoklonal reseptor 3OC6 (fremkalt fra forbindelse 1a) indikerte at den basiske form av en dissosierbar gruppe var involvert i katalysen. Også observert var uavhengigheten av K_{kat}^{app} av konsen-

trasjonen av disse prøvene, slik som de ble funnet med monoklonal reseptor 27A6 som var fremkalt av forbindelse 5a (figur 1). I motsetning til adferden til reseptor 3OC6 var observasjonene av en pH-avhengighet av K_{kat}^{app} med reseptor 27A6 (figur

3A). Selv om denne observasjon synes å være i strid med kjer-
nen av "lokke og dreie"-teorien, er det antatt at pK_a av de
kombinerende sete-aminosyrerestsidekjeder kan ligge utenfor
det undersøkte pH-område, eller at protein-substratelektro-
5 statiske interaksjoner (elektrostatisk katalyse) er det essen-
sielle trekk ved denne reseptors evne til å akselerere reak-
sjonen [Fersht, Enzyme Structure and Mechanism, Freeman, red.,
New York (1985)].

Selv om man ikke var i stand til å påvise noen amino-
10 syreinnbefattelse i den reseptor 27A6-hydrolytiske reaksjon
via pH-effekter, ble en spesifikk inaktivering av alle tre
(27A6, 57G12, 70F3) katalytiske antistoffer observert ved an-
vendelse av det argininmodifiserende reagens fenylglyoxal
[Takahashi, J. Biol. Chem., 243:6171 (1968)]. Tapet av
15 aktivitet (katalytisk/bindende) kan fortolkes som å skyldes
reaksjon av reagenset med en aminosyrerestsidekjede i det bin-
dende sete; og dette kan reduseres signifikant ved nærvær av
haptенforbindelse 5b.

En strukturforandring etter reaksjonen av reagenset
20 ved et forskjellig sete vil imidlertid føre til en lignende
konklusjon. Således er det mulig at en argininrest et eller
annet sted enn i det bindende sete er kjemisk forandret, noe
som fører til stabilisering av strukturer av proteinet hvori
det bindende sete er forandret slik at det ikke lenger binder
25 substratforbindelse 3 eller haptенforbindelse 5. Denne kompli-
kasjon synes ikke å gjelde her.

Katalytiske og ELISA-utprøvningsviser, og tidligere
bindingsstudier observert av Freedman et al., Immunochem.,
9:169 (1972) og Mayers et al., Immunochem., 9:169 (1972), at
30 glyoxylering av guanidiniumgrupper ødelegger katalytisk
og/eller bindingsaktivitet bare av antistoffer mot negativt
ladede haptener, og ikke av antistoffer mot nøytral haptенfor-
bindelse 6 eller positivt ladet haptенforbindelse 7. Hvis gly-
oxylering utviste en effekt ved forandring av et guanidinium
35 fjernt fra bindingssetet ved den ovenfor angitte mekanisme, er
det vanskelig å se hvorfor antistoffer mot forbindelse 6 eller
7-haptенene ikke ville bli påvirket på lignende måte. Det er
således antatt at et arginin hvis guanidiniumsidegruppe har en

pK_a-verdi over det her studerte område, er i bindingssetet og er involvert med den observerte katalyse.

Et samspill av multiple ladninger som kan fremkalle et utall katalytiske grupper, forutses, noe som gir en additiv hastighetseffekt. Denne effekt kombinert med adgang til et meget større repertoar av potensielle, katalytiske antistoffer [Shastri et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728 (1989)] forbedrer sannsynligheten for å utvikle glimrende katalysatorer.

10

V. Ligandfremstilling

Med mindre annet er angitt, ble reaksjonene utført i flammetørket glassvare under en nitrogenatmosfære. Reagens- og løsningsmiddeloverføringer ble foretatt med ovnstørkede sprøyter og nåler. Diklormethan og acetonitril ble kontinuerlig destillert fra kalsiumhydrid. Tetrahydrofuran a (THF) ble destillert fra natriummetall/benzofenonketyl. Alle reagenser ble levert fra Aldrich Chemical Company. Alle kromatografiløsningsmidler ble erholdt kommersielt og anvendt som de ble mot-

20 tatt. Reaksjonene ble overvåket ved analytiske tynnsjikt-kromatografiske metoder (TLC) ved anvendelse av E. Merck silicagel 60F glassplater (0,25 mm). Flashkromatografi ble utført ved anvendelse av E. Merck silicagel 60 (230-400 mesh) som beskrevet av Still et al., J. Org. Chem., 43:2923 (1978).

25

Smeltepunkter ble bestemt på en Fisher-Johns smeltepunktapparat og er ukorrigert. Alle proton-NMR-spektra (300 MHz) ble erholdt i CDCl₃-, CD₃CN- eller DMSO-løsninger ved omgivende temperatur på et "Bruker AM-300" spektrometer, kjemiske skiftninger (α) er angitt i deler pr. million i forhold til internt tetramethylsilan (0,00 ppm). Elementæranalyser (C, H, N) ble utført av Galbraith Laboratories, Knoxville, TN.

30

Eksempel 1: p-nitrofenylacetaldehyd

p-nitrofenylacetaldehyd ble fremstilt ved metoden beskrevet i Lethbridge et al., J. Chem. Soc. Perkin I, 35 (1973) fra p-nitrofenylethylen. p-nitrofenylethylen ble fremstilt ved metoden beskrevet i Strassburg et al., J. Am. Chem. Soc. 69:2142 (1947) fra 1-brom-2-(p-nitrofenyl)ethan (kom-

35

mersielt tilgjengelig fra Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI).

Eksempel 2: Forbindelse I

5 n-butyllithium ($3,33 \times 10^{-2}$ mol) ble tilsatt til tetrahydrofuran (THF; 100 ml) opprettholdt ved -100°C i et ether/nitrogenbad. 2-brompyridin ($3,64 \times 10^{-2}$ mol) ble tilsatt til denne blanding under omrøring i 15 minutter. Reaksjonsblanding

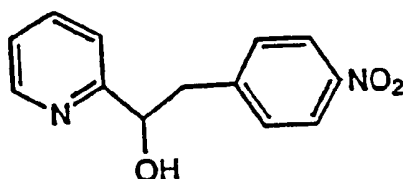
10 karten ble hevet til -78°C ved overføring av reaksjonskaret til et aceton/ CO_2 -bad, og blandingen ble omrørt i 1 time. p-nitrofenylacetaldehyd (5 g, $3,03 \times 10^{-2}$ mol) erholdt fra eksempel 1 oppløst i 30 ml THF, ble langsomt tilsatt til reaksjonsblanding, og blandingen ble omrørt i 3 timer ved -78°C .

15 Etter omrøring ble blandingen helt over i en mettet løsning av 500 ml ammoniumklorid og diethylether. Blanding ble ekstrahert to ganger med diethylether, de kombinerte etherlag ble tørket over natriumsulfat og ble kjørt på en kolonne i 15% CH_3CN i CH_2Cl_2 . Produktet, forbindelse I (1-hydroxy-1-(2-pyridinyl)-2-(p-nitrofenyl)-ethan), ble oppsamlet

20 til et utbytte på 648 mg ($2,7 \times 10^{-3}$ mol, 9% utbytte).

^1H NMR δ 8,55 (d, 1H); 8,10 (d, 2H); 7,65 (m, 1H); 7,3 (d, 2H); 7,2 (m, 2H); 5,05 (dd, 1H); 3,20 (m, 2H).

25



30

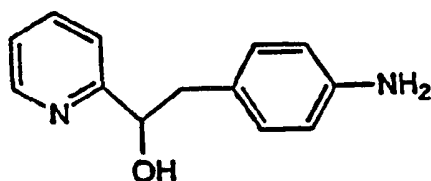
Forbindelse I

Eksempel 3: Forbindelse II

35 12 ml tørr metanol ble tilsatt til et tørt 25 ml reaksjonskar spylt med nitrogen.

100 mg forbindelse I erholdt i eksempel 2, ble oppløst i metanol under dannelse av en orangerfarget løsning.

Løsningen ble spylt med nitrogen, og 10% palladium på carbon (Pd/C, 75 mg) ble tilsatt til løsningen. Sidene av reaksjonskaret ble vasket med en liten mengde methanol, og løsningen ble spylt med nitrogen og deretter spylt med hydrogen. Reaksjonsblandingen ble omrørt i ca. 1 time og ble deretter filtrert gjennom et sjikt av celitt. Filteret ble skyllet fire ganger med diklormethan (CH₂Cl₂) og ble deretter skyllet tre ganger med methanol inntil ikke noe tynnsjiktskromatografisk (TLC) flekkmateriale ble erholdt fra filteret. Filtratskyllevæskene ble tørket med natriumsulfat og fordampet til tørrhet under dannelse av 85,6 mg (97,6% utbytte) av gult, krystallinsk, fast materiale, forbindelse II (1-hydroxy-1-(2-pyridinyl)-2-(p-aminofenyl)ethan).



Forbindelse II

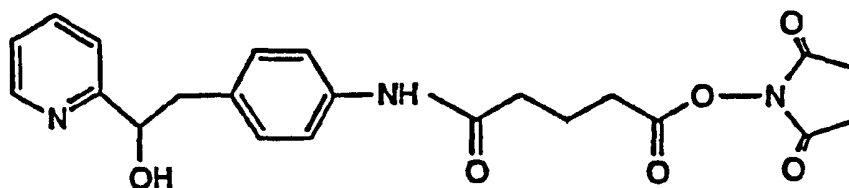
Eksempel 4: Forbindelse 2

Forbindelse II (155 mg, $7,24 \times 10^{-4}$ mol) fra eksempel 3, ble blandet med 1,5 ml tørt CH₂Cl₂ og triethylamin [(Et₃N) ($1,45 \times 10^{-3}$ mol)]. N-hydroxysuccinimidoylglutaroyl-klorid (359 mg, $1,45 \times 10^{-3}$ mol) ble tilsatt, og den resulterende reaksjonsblanding ble omrørt ved 25°C i ca. 40 minutter. Reaksjonsproduktet ble fordampet til tørrhet ved rotasjonsfordampning under dannelse av 61,5 mg (20% utbytte) av 5-[(2,5-dioxo)-1-pyrrolidinyl]oxy]-N-[4-[2-hydroxy-2-(2-pyridinyl)-ethyl]fenyl]-5-oxo-pentanamid, (forbindelse 2).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9,82 (s, 1H); 8,48 (d, 1H, J=4,3 Hz); 7,75 (dd, 1H, J=2 x 7,6 Hz); 7,42 (d, 2H, J=7,9 Hz); 7,22 (m, 2H); 7,05 (d, 2H, J=7,9 Hz); 5,38 (d, 1H, J=5,1 Hz); 4,76 (dd, 1H, J=4,0, 3,5 Hz); 3,05 (dd, 2H, J=13,7, 4,0 Hz); 2,80 (s, 4H); 2,76 (t, 2H, J=8,2 Hz); 2,42 (t, 2H, J=8,2 Hz); 1,90 (m, 2H).

Anal. beregnet for $C_{22}H_{23}N_3O_6$: C 62,12 H 5,41 N 9,88

Funnet: C 62,19 H 5,37 N 9,92%



Forbindelse 2

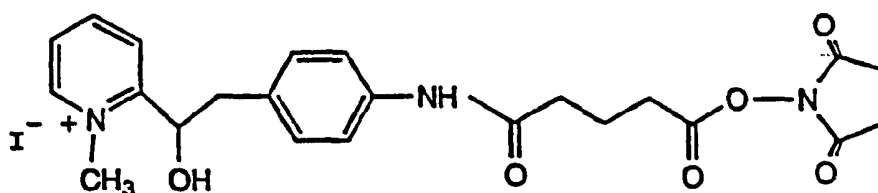
Eksempel 5: Forbindelse 1a

Forbindelse 2 (30 mg, $7,06 \times 10^{-5}$ mol) fra eksempel 4 ble blandet med metyljodid ($7,06 \times 10^{-4}$ mol) i 0,5 ml aceton og kokt under tilbakeløpskjøling i ca. 17 timer. Reaksjonsblandingen ble skyllet tre ganger med kloroform og deretter skyllet tre ganger med varmt ethylacetat under dannelsen av 20 mg (50% utbytte) av haptensisk ligand 2-[2-[5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyloxy)-1,5-dioxopentyl]-4-aminofenyl]-1-hydroxyethyl]-1-methylpyridiniumjodid, (forbindelse 1a).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9,86 (s, 1H); 8,92 (d, 1H, $J=6,1$ Hz); 8,55 (d, 1H, $J=8,0$ Hz); 8,08 (t, 1H, $J=6,8$ Hz); 8,00 (t, 1H, $J=7,9$ Hz); 7,48 (d, 2H, $J=7,9$ Hz); 7,12 (d, 2H, $J=7,9$ Hz); 6,30 (d, 1H, $J=5,1$ Hz); 5,34 (dd, 1H, $J=4,0, 3,5$ Hz); 4,35 (s, 3H); 3,02 (dd, 2H, $J=13,6, 4,0$ Hz); 2,80 (s, 4H); 2,72 (t, 2H, $J=8,2$ Hz); 2,45 (t, 2H, $J=8,2$ Hz); 1,90 (m, 2H).

Anal. beregnet for $C_{23}H_{26}N_3O_6I$: C 48,67 H 4,59 N 7,41

Funnet: C 48,11 H 4,51 N 7,37%



Forbindelse 1a

Eksempel 6: 2-[(4-nitrofenyl)methyl]-1,3-dioxolan
(forbindelse III)

5 p-nitrofenylacetaldehyd (500 mg, $3,0 \times 10^{-3}$ mol) ble
oppløst i ca. 1,5 ml CH_2Cl_2 . 383 mg CaSO_4 ble tilsatt til blan-
dingen etterfulgt av "Rexyn 101" harpiks (protonform, Fisher
Scientific; 128 mg) og ethylenglycol ($13,8 \times 10^{-3}$ mol). Blan-
dingen ble omrørt under nitrogen i ca. 4 timer. Før anvendelse
10 ble "Rexyn 101" og CaSO_4 opprettholdt i 20 timer ved ca. 120°C
i en tørkeovn og ble deretter avkjølt i en eksikkator.

En prøve ble fjernet og anbrakt på en TLC i ren
 CH_2Cl_2 . Ytterligere "Rexyn 101" og CaSO_4 ble tilsatt, og blan-
dingen ble omrørt over natten (ca. 16-18 timer). 10 ml CH_2Cl_2
15 ble tilsatt til den omrørte blanding. En prøve ble anbrakt på
TLC og utviste ikke noe flekkdannende materiale.

10 ml vann ble tilsatt, blandingen ble omrørt, og det
organiske lag ble fraskilt, tørket med natriumsulfat og renset
ved flashkromatografi under anvendelse av hexan:ethylacetat
20 (2:1) under dannelse av 435,8 mg (70% utbytte) av forbindelse
III.

^1H NMR: δ 8,10 (d, 2H); 7,4 (d, 2H); 5,10 (t, 1H);
3,8 (s, 4H); 3,0 (d, 2H).

I en andre fremstilling ble ethylenglycol (5,4 ml, 97
25 mmol) tilsatt til en omrørt løsning av p-nitrofenylacetaldehyd
(3,0 g, 18,2 mmol) i 10,0 ml metylenklorid. Til dette ble det
tilsatt 1,0 g "Rexyn 101" (H) (Fisher Scientific) kationbyt-
terharpiks og 3,0 g pulverformet kalsiumsulfat som var blitt
ovnstørket (120°C) over natten. Blandingens ble omrørt i 24
30 timer ved romtemperatur, og reaksjonsblandingen ble deretter
helt over i 100 ml H_2O og ekstrahert tre ganger med 50 ml por-
sjoner metylenklorid. Kombinerte, organiske lag ble tørket
med natriumsulfat og renset ved flashkromatografi, 2:1
hexan:ethylacetat, under dannelse av 2,28 g, 60% av den teo-
35 retiske mengde.

^1H NMR (CDCl_3) δ 8,18 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 7,42 (d, $J=8,6$
Hz, 2H), 5,08 (t, $J=4,3$ Hz, 1H), 3,8-4,0 (m, 4H), 3,06
(d, $J=4,3$ Hz, 2H).

Anal. beregnet for $C_{10}H_{11}NO_4$: C 57,42 H 5,26 N 6,70
Funnet: C 57,51 H 5,19 N 6,65

Eksempel 7: 4-(1,3-dioxolan-2-ylmethyl)-benzenamin
(forbindelse IV)

231 mg av forbindelse III fra eksempel 6 ble oppløst i ca. 3 ml methanol, og blandingen ble spylt med nitrogen. 120 mg Pd/C ble tilsatt til blandingen, og sidene av reaksjonskolben ble skyllet med ca. 2 ml methanol. Blandingen ble spylt med nitrogen og ble deretter spylt med hydrogen. Reaksjonsblandingens ble omrørt i 45 minutter og ble deretter filtrert gjennom celitt. Celitten ble skyllet flere ganger med methanol, og filtratet og skyllevæskene ble rotasjonsfordampet under dannelse av 184,4 mg (90,6% utbytte) av forbindelse IV.

I en annen fremstilling ble forbindelse III (2,0 g, 9,6 mmol) tilsatt til 20 ml methanol. Til denne suspensjon ble det tilsatt 10% palladium på aktivert carbon (200 mg), og kolben ble utstyrt med en ballong av hydrogen og ble hurtig omrørt ved romtemperatur i 6 timer. Reaksjonsblandingens ble filtrert gjennom celitt og konsentrert under dannelse av 1,63 g, 95% av teoretisk mengde. Dette materiale ble anvendt uten ytterligere rensing i gjentagelsen av det etterfølgende eksempel. TLC $R_f=0,3$, 1:1 ethyl.

Eksempel 8: N-[4-(1,3-dioxolan-2-ylmethyl)fenyl]-N-(fenylmethyl)-benzenmethanamin
(forbindelse V)

Forbindelse IV (1,91 g, $1,07 \times 10^{-2}$ mol) fra eksempel 7 ble blandet med 10 ml CH_2Cl_2 og Et_3N (4,45 ml, $3,2 \times 10^{-2}$ mol) og omrørt. Benzylbromid ($1,07 \times 10^{-1}$ mol) ble dråpevis tilsatt til den omrørte blanding etter at ca. halvparten av forbindelse IV var oppløst i løsningen. Alt av aminet ble deretter oppløst. Reaksjonen ble stanset etter ca. én time. Løsningen ble kjørt på en kolonne i $CH_2Cl_2:HCl$ (9:1), og 3,048 mg (79% utbytte) av det ønskede produkt ble oppsamlet (forbindelse V):
 ^1H NMR: δ 7,25 (s, 1OH); 7,05 (d, 2H); 6,85 (d, 2H);
5,00 (t, 1H); 4,60 (s, 4H); 3,9 (m, 4H);
2,8 (d, 2H).

Ved gjentagelse av den ovenfor angitte syntese ble det til en omrørt suspensjon av forbindelse IV (2 g, 11,2 mmol) i 10 ml metylenklorid tilsatt triethylamin (4,5 ml, 32 mmol). Tilsetning av benzylbromid (6,4 ml, 107 mmol) ble fore-
5 tatt dråpevis i løpet av 30 minutter under hurtig omrøring, og hvor den resulterende blanding ble omrørt i ytterligere 60 minutter. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med 50 ml metylenklorid og ekstrahert med (2x25 ml) 0,5M HCl. De kombinerte, organiske ekstrakter ble tørket med natriumsulfat og rens
10 ved flashkromatografi i 4:1 metylenklorid:hexan, under dannelse av 3,2 g, 80% av den teoretiske mengde. ^1H NMR (CDCl_3) δ 7,35-7,23 (m, 10H), 7,06 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,66 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,50 (s, $J=4,3$ Hz, 1H), 4,62 (s, 4H), 3,8-4,00 (m, 4H), 2,82 (d, $J=4,3$ Hz, 2H).
15 Anal. beregnet for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_2$: C 80,22 N 6,96 N 3,90
Funnet: C 80,35 H 7,11 N 3,86

Eksempel 9: 4-[bis(fenylmethyl)amino-benzenacetaldehyd
(forbindelse VI)

20 Forbindelse V (2 g, $5,6 \times 10^{-3}$ mol) fra eksempel 8 ble oppløst i 6 ml aceton og omrørt under nitrogen. 6 ml 4M HCl ble tilsatt til blandingen, og omrøringen ble fortsatt inntil reaksjonsblandingen var svakt gul. Reaksjonsblandingen ble overført til en skilletrakt inneholdende CH_2Cl_2 og vasket
25 med vandig NaCl. Det organiske lag ble tørket med natriumsulfat og lagret under vakuum over natten (16-18 timer).

En prøve ble kjørt på TLC, og beising med ninhydrin utviste 5 flekker i CH_2Cl_2 :hexan (4:1). Reaksjonsproduktet ble anbrakt på en 50 mm preabsorbert silicakolonne, og 500 mg (29%
30 utbytte) av flekken svarende til det ønskede produkt (forbindelse VI) ble oppsamlet.

^1H NMR: δ 9,5 (t, 1H); 7,1 (s, 10H); 6,8 (d, 2H);
4,5 (s, 4H); 3,4 (d, 2H).

I en annen fremstilling ble det til en løsning av
35 2,0 g (5,6 mmol) av forbindelse V i 15 ml aceton tilsatt 2 ml 4M HCl. Denne løsning ble omrørt i 24 timer ved romtemperatur. 10 g silica ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og blandingen ble konsentrert til tørrhet. Flashkromatografi ble kjørt i

4:1 metylenklorid:hexan med det preabsorberte, urene reaksjonsprodukt under dannelsen av 0,7 g, 40% av den teoretiske mengde. ^1H NMR (CDCl_3) δ 9,7 (t, $J=2,9$ Hz, 1H), 7,40-7,20 (m, 1OH), 7,00 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,7 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 4,66 (s, 4H), 3,54 (d, $J=2,9$ Hz, 2H).

Anal. beregn. $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}$: C, 83,81; H, 6,67; N, 4,44.

Funnet: C, 84,06; H, 6,58; N, 4,50.

Eksempel 10: 2-[2-(4-aminofenyl-1-hydroxyethyl)-benzoesyre
(forbindelse VII)

2-brombenzoesyre (88 mg, $4,33 \times 10^{-4}$ mol) ble oppløst i 2 ml THF og avkjølt til -78°C . n-butyllithium (n-BuLi) ($8,38 \times 10^{-4}$ mol) ble tilsatt, og blandingen ble omrørt i 2 timer.

Forbindelse VI (91 mg, $2,89 \times 10^{-4}$ mol) erholdt i eksempel 9, oppløst i 1 ml THF, ble tilsatt til blandingen, og blandingen ble omrørt i 4 timer ved -78°C . Reaksjonsblanding ble fortynnet i ethylacetat og vasket to ganger med mettet NH_4Cl , etterfulgt av én vasking med 1M HCl. Den organiske fraksjon ble fraskilt, tørket med natriumsulfat og rotasjonsfordampet over natten (ca. 16-18 timer).

TLC av produktet i CH_2Cl_2 :hexan (4:1) viste to flekker. Begge flekker ble oppsamlet fra en kolonne. Det ønskede produkt ble erholdt under dannelsen av 32 mg (25% utbytte) som forbindelse VII.

^1H NMR: 7,1-7,8 (m, 14H); 6,9 (d, 2H); 6,6 (d, 2H); 5,6 (t, 1H); 4,6 (s, 4H); 3,0 (m, 2H)

I en annen fremstilling ble 2-brombenzoesyre (957 mg, 4,8 mmol) oppløst i 20 ml tetrahydrofuran og avkjølt til -78°C (CO_2 /aceton), n-butyllithium (n-BuLi; 5,8 mM, 1,6M i hexan, 9,2 mmol) ble tilsatt, og blandingen ble omrørt i én time. Aldehydforbindelse VI (1,9 g, 3,2 mmol) oppløst i 10 ml tetrahydrofuran avkjølt til -78°C , ble tilsatt via en kanyle og ble deretter omrørt i 4 timer ved -78°C . Reaksjonsblanding ble helt over i mettet ammoniumklorid etterfulgt av ekstraksjon med 2 x 50 ml ethylacetat. De kombinerte, organiske ekstrakter ble tørket med natriumsulfat og renset ved flashkromatografi under anvendelse av rent metylenklorid under dannelsen av 860 mg, 62% av den teoretiske mengde.

^1H NMR (CDCl_3) δ 7,90-7,80 (m, 1H), 7,68-7,40 (m, 2H), 7,40-7,05 (m, 11H), 7,0 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,64 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,62 (t, $J=7,1$ Hz, 2H), 3,64 (br s, 2H), 3,4-2,8 (m, 2H).

- 5 Anal. beregnet for $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{NO}_3$: C 80,37 H 6,24 N 3,23
Funnet: C 80,44 H 6,29 N 3,19

Eksempel 11: 2-[2-[4-[bis(fenylmethyl)amino]fenyl]-1-hydroxyethyl]-benzoesyre (forbindelse 5b)

- 10 32 mg av forbindelse VII erholdt i eksempel 10, ble oppløst i 2 ml metanol. 10 mg Pd/C ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble spylt med hydrogen og omrørt i ca. 1,5 time inntil alt flekkdannende materiale var borte, som bestemt ved TLC i CH_2Cl_2 :ethylacetat (1:1) under dannelse av 16,2 mg (86%
15 utbytte) av forbindelse 5b.

- I en gjentatt syntese ble carboxylatforbindelse VII (320 mg, $7,3 \times 10^{-4}$ mol) oppløst i 20 ml metanol. Dette ble etterfulgt av tilsetning av 10% palladium på aktivert carbon (32 mg), fylling av kolben med hydrogen og hurtig omrøring i
20 90 minutter. Filtrering gjennom celitt etterfulgt av konsentrering ga 179 mg, 95% av teoretisk mengde. Dette materiale ble anvendt uten ytterligere rensing ved gjentakelsen av det følgende eksempel. TLC $R_f=0,6$, 1:1 metylenklorid:ethylacetat.

- 25 Eksempel 12: 2-[2-[4-[5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-1,5-dioxopentyl]amino]fenyl]-1-hydroxyethyl-benzoesyre (forbindelse 5a)

- Forbindelse 5b (16,2 mg, $6,3 \times 10^{-5}$ mol) erholdt i eksempel 11, ble oppløst i 70 μl CH_2Cl_2 , og Et_3N ($1,26 \times 10^{-4}$
30 mol) ble tilsatt under omrøring.

- N-hydroxysuccinimidoylglutaroylchlorid (19,1 mg, $8,19 \times 10^{-5}$ mol) ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble omrørt under nitrogen. Reaksjonsblandingen ble deretter anbrakt direkte på en preparativ TLC-plate og eluert med CH_2Cl_2 :ethyl-
35 acetat (1:1) under dannelse av 14,3 mg (50% utbytte) av den ønskede hapteniske ligandforbindelse 5a.

^1H NMR: δ 9,2 (s, 1H); 7,2-6,8 (m, 6H); 6,6 (d, 2H); 5,2 (t, 1H); 2,6 (m, 2H); 2,1 (s, 4H);

2,0 (t, 2H); 1,8 (t, 2H); 1,4 (m, 2H).

I en gjentatt syntese ble carboxylat VIII (100 mg, $3,9 \times 10^{-4}$ mol) oppløst i 800 μ l metylenklorid og triethylamin (109 μ l, $7,8 \times 10^{-4}$ mol). Denne oppløsning ble etterfulgt av
 5 tilsetning av (5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyloxy]-5-oxo-pentan-
 oylklorid (118 mg, $5,1 \times 10^{-4}$ mol) og omrøring i 20 minutter.
 Rensing ble utført ved å fylle den urene reaksjonsblanding på
 en flashkromatografikolonne og eluering med 1:1 metylen-
 klorid:ethylacetat under dannelsen av 159 mg, 90% av den teo-
 10 retiske mengde.

^1H NMR (CDCl_3) δ 9,24 (s, 1H), 7,36-6,8 (m, 6H), 6,42
 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,20 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 2,66-2,36 (m,
 2H), 2,15 (s, 4H), 2,1-1,96 (m, 2H), 1,96-1,7 (m, 2H),
 1,5-1,16 (m, 2H).

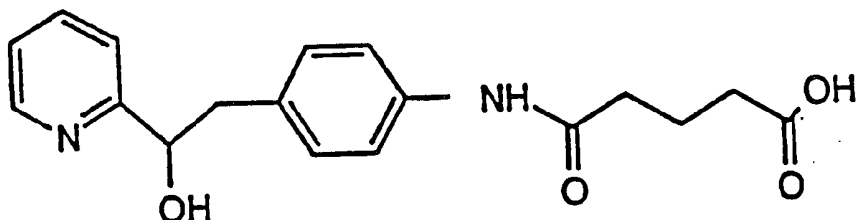
15 Anal. beregnet for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$: C 61,54 H 5,13 N 5,98
 Funnet: C 61,62 H 5,10 N 5,89

Eksempel 13: Forbindelse IX

Forbindelse II, fra eksempel 3 (262 mg, $1,22 \times 10^{-3}$
 20 mol), og 140 mg glutarsyreanhydrid ble oppløst i 10 ml CH_2Cl_2
 og omrørt i 16 til 18 timer. Ytterligere 40 mg glutarsyrean-
 hydrid ble tilsatt til løsningen, og reaksjonsblandingen ble
 omrørt i 3 timer og deretter helt over i en vandig løsning av
 Et_3N ($1,47 \times 10^{-3}$ mol). Løsningen ble deretter fortynnet med
 25 ethylacetat, og det vandige lag ble fjernet og surgjort med
 trifluoreddiksyre (TFA). Det vandige lag ble ekstrahert med
 ethylacetat, renses ved HPLC under anvendelse av en standard
 10:90 til 90:10 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ -gradient, og 240 mg (60% utbytte) av
 den ønskede forbindelse (forbindelse IX) ble erholdt.

30 ^1H NMR: δ 8,3 (m, 3H); 7,6 (t, 2H); 6,9 (d, 2H);
 6,7 (d, 2H); 5,1 (t, 1H); 2,8 (m, 2H);
 2,0 (m, 4H); 1,5 (m, 2H).

5



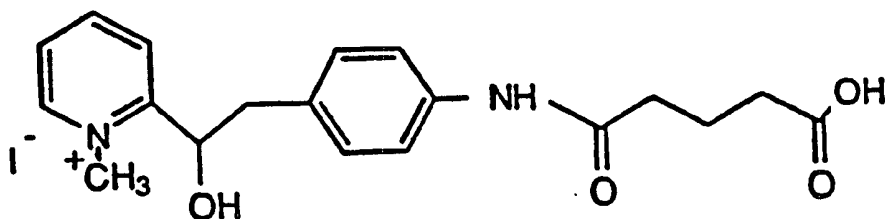
Forbindelse IX

10 Eksempel 14: Forbindelse 1b

Forbindelse IX (58 mg, $1,77 \times 10^{-4}$ mol) fra eksempel 13 ble blandet med metyljodid ($8,84 \times 10^{-4}$ mol) og oppløst i et forseglet rør i aceton (ca. 5 ml) og oppvarmet i ca. 16 til 18 timer ved 80°C. Bunnfallet ble filtrert og skyllet med CHCl_3 under dannelse av 56 mg (67% utbytte) av forbindelse 1b.

^1H NMR: δ 8,5-7,5 (m, 4H); 7,2-6,8 (m, 4H); 5,2 (t, 1H); 3,2 (m, 2H); 2,2 (t, 2H); 1,8 (t, 2H); 1,2 (m, 2H).

20



25

Forbindelse 1b

Eksempel 15: Forbindelse X

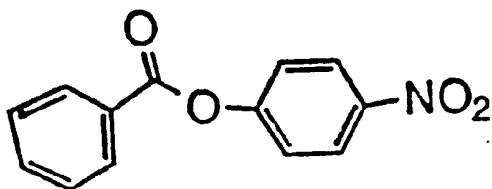
p-nitrofenol (1 g, $7,19 \times 10^{-3}$ mol) ble oppløst i 3 ml CH_2Cl_2 , og Et_3N ($7,19 \times 10^{-3}$ mol) ble tilsatt under dannelse av en gulfarget løsning.

Benzylklorid ($8,63 \times 10^{-3}$ mol) ble tilsatt dråpevis til løsningen, noe som resulterte i noe kokning. Den gule farge forsvant etter ca. 5 minutter, og et bunnfall ble dannet. 2 ml CH_2Cl_2 ble tilsatt til den bunnfallsholdige løsning etterfulgt av tilsetning av 3 ml ethylacetat som oppløste bunnfallet. Løsningen ble omrørt i én time.

Løsningen ble blandet med vann og omrørt i ca. 45

minutter etterfulgt av vasking i 1M HCl og deretter to vaskinger med 10% NaHCO₃, to vaskinger med 1M HCl og to vaskinger med mettet NaCl. Det organiske lag ble tørket med natriumsulfat, ble rotasjonsfordampet, lagret under vakuum og separert på en kolonne i CH₂Cl₂:hexan (2:1). Den lavere R_f-flekk på TLC ble oppsamlet under dannelsen av 1,2613 g (72% utbytte) av forbindelse X (p-nitro-fenylbenzoat).

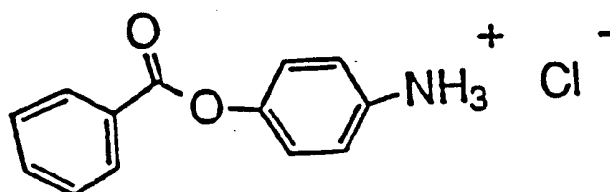
¹H NMR: δ 8,4-8,0 (m, 4H); 7,7-7,3 (m, 5H).



Forbindelse X

Eksempel 16: Forbindelse XI

Forbindelse X (530 mg, $2,18 \times 10^{-3}$ mol) fra eksempel 15, 200 μ l 12M HCl, 275 mg Pd/C og hydrogen gass ble blandet i ca. 15 ml metanol og omrørt i 2,5 timer under nitrogen inntil alt flekkdannende materiale, som bestemt ved TLC i CH₂Cl₂:MeOH (9:1), var borte. Løsningen ble filtrert og tørket under dannelsen av 518 mg (95% utbytte) av forbindelse XI.



Forbindelse XI

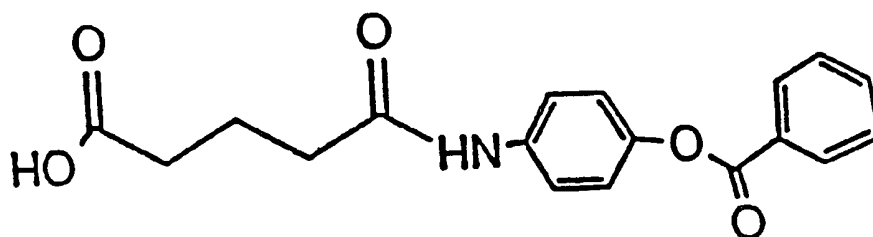
Eksempel 17: Forbindelse 3

Forbindelse XI (518 mg, $2,08 \times 10^{-3}$ mol) fra eksempel 16 ble blandet med 10 ml CH₂Cl₂ og glutarsyreanhydrid (260 mg,

2,28 x 10⁻³ mol). Et₃N (4,58 x 10⁻³ mol) ble oppløst i løsningen, og reaksjonsblandingen ble omrørt i 16 til 18 timer.

TLC viste flekkdannende materiale i CH₂Cl₂:ethylacetat (9:1). Mer glutarsyreanhydrid (0,25 mg) ble tilsatt til løsningen, og reaksjonsblandingen ble omrørt i ytterligere 3 timer inntil alt flekkdannende materiale var borte. Løsningen ble fortynnet med ethylacetat, vasket to ganger med 1M HCl. Den organiske fase ble tørket med natriumsulfat og fordampet under dannelse av 655 mg urent produkt. Det urene produkt ble renset ved FPLC i CH₃CN:CH₃OH:H₂O (4:1:4) under dannelse av 397 mg av forbindelse 3.

¹H NMR: δ 9,9 (s, 1H); 8,1 (d, 2H); 7,7-7,4 (m, 5H); 7,1 (d, 2H); 2,3 (t, 4H); 1,8 (m, 2H).



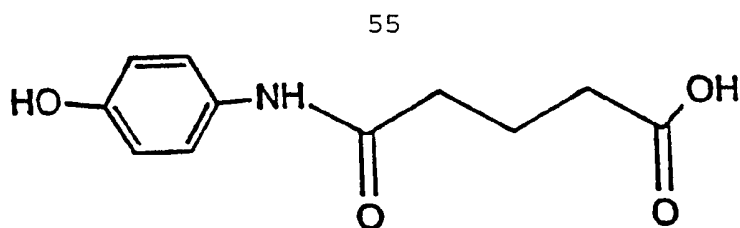
Forbindelse 3

Eksempel 18: Forbindelse 4

Glutarsyreanhydrid (1,34 g, 1,17 x 10⁻² mol) og p-aminofenol (1,6 g, 1,47 x 10⁻² mol) ble oppløst i 5 ml CH₂Cl₂ og omrørt ved 35°C i 1 time. Blandingen ble fortynnet i ethylacetat og vasket to ganger med 1M HCl. Det organiske lag ble tørket med natriumsulfat og rotasjonsfordampet. HPLC viste produktet oppløst i det vandige lag som ble lyofilisert under dannelse av 214 mg urent produkt.

Det urene produkt ble oppløst i 16 ml H₂O, 5 ml methanol og 5 ml CH₃CN og renset ved FPLC under dannelse av 89 mg av forbindelse 4.

¹H NMR: δ 9,6 (s, 1H); 7,3 (d, 2H); 6,6 (d, 2H); 2,2 (m, 4H); 1,7 (m, 2H).



5 Forbindelse 4

Eksempel 19: 2-[2-(4-aminofenyl)-1-hydroxyethyl]-1-methylbenzen (forbindelse XII)

n-BuLi (2,8 ml, 2,6M i hexan, 4,4 mmol) ble tilsatt
 10 til 30 ml THF og avkjølt til -78°C. Til denne løsning ble det
 tilsatt 2-bromtoluen (0,573 ml, 4,8 mmol), og blandingen ble
 omrørt i 30 minutter. Aldehydforbindelse VI (1,9 g, 3,2 mmol)
 oppløst i 15 ml THF og avkjølt til -78°C, ble deretter til-
 satt, og den resulterende blanding ble omrørt i 2 timer. Reak-
 15 sjonsblandingen ble helt over i en mettet ammoniumklorid-
 løsning og ekstrahert med 2 x 25 ml metylenklorid. De kom-
 binerte, organiske lag ble tørket med natriumsulfat og rensset
 ved flashkromatografi i 6:1:1,5 hexan:metylenklorid:ethyl-
 acetat under dannelsen av 900 mg av forbindelse XII, 69% av den
 20 teoretiske mengde. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,9-7,8 (m, 1H), 7,68-7,40
 (m, 2H), 7,40-7,15 (m, 12H), 7,05 (d, J=8,6 Hz, 2H), 6,70 (d,
 J=8,6 Hz, 2H), 5,3 (t, J=7,1 Hz, 1H), 4,62 (s, 4H), 3,0-2,7
 (m, 2H), 2,3 (s, 3H).

Anal. beregn. for C₂₉H₂₉NO: C, 85,50; H, 7,13; N, 3,44.

25 Funnet: C, 85,58; H, 7,08; N, 3,41.

Eksempel 20: 2-[2-[4-[bis(fenylmethyl)amino]fenyl]-1-hydroxyethyl]-1-methylbenzen (forbindelse XIII)

Til en løsning av forbindelse XII (900 mg, 2,2 mmol)
 30 i 50 ml ethylacetat ble det tilsatt 10% palladium på aktivert
 carbon (100 mg). Reaksjonskaret ble komprimert til 3,5 kg/cm²
 med hydrogen på en Parr-hydrogeneringsapparat. Reaksjonen
 var fullført etter 4 timer og ble deretter filtrert gjennom
 celitt og konsentrert i vakuum under dannelsen av 476 mg av
 35 forbindelse XIII, 95% av den teoretiske mengde. Dette materi-
 ale ble anvendt uten ytterligere rensing i det neste eksempel.
 TLC R_f=0,05, 4:1 metylenklorid:hexan.

Eksempel 21: 2-[2-[4-carboxy-1-oxobutyl)amino]fenyl]-
1-hydroxyethyl]-1-methylbenzen
(forbindelse 6)

Til en løsning av forbindelse V (476 mg, 2,1 mmol)
 5 i 10 ml metylenklorid inneholdende triethylamin (351 µl,
 2,5 mmol), ble det tilsatt (5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)-
 oxyl]-5-oxo-pentanoyl)klorid (572 mg, 2,3 mmol). Løsningen ble
 omrørt i 30 minutter hvorefter den ble fortynnet med 25 ml
 ethylacetat, vasket med 1M HCl (2 x 15 ml) og tørket med
 10 natriumsulfat. Det urene materiale ble renset ved flash-
 kromatografi, 1:1 metylenklorid:ethylacetat under dannelsen
 av 780 mg av forbindelse 6, 85% av teoretisk mengde. ¹H
 NMR (CDCl₃) δ 9,24 (s, 1H), 7,4-6,85 (m, 6H), 6,45 (d,
 J=8,6 Hz, 2H), 5,20 (t, J=7,1 Hz, 1H), 2,65-2,4 (m, 2H)
 15 2,3 (s, 3H), 2,15 (s, 4H), 2,1-1,96 (m, 2H), 1,96-1,72
 (m, 2H), 1,5-1,20 (m, 2H).
 Anal. beregnet for C₂₄H₂₆N₂O₆: C 65,75 H 5,94 N 6,39
 Funnet: C 65,79 H 5,91 N 6,41

20 Eksempel 22: 5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)-ox]-N-
[4-(hydroxymethyl)fenyl]-5-oxo-pentanamid
(forbindelse XIV)

Til en løsning av triethylamin (1,13 ml, 8,2 mmol) i
 10 ml metylenklorid ble det oppløst p-aminobenzylalkohol
 25 (1,9 g, 8,1 mmol). Til denne løsning ble det tilsatt (5-[(2,5-
 dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-5-pentanoyl)klorid (2,21 g, 8,9
 mmol), og blandingen ble omrørt i 1 time. Reaksjonsblandingen
 ble fortynnet med 25 ml metylenklorid og ekstrahert med 2 x
 26 ml av en 2M HCl-løsning. Det resulterende, organiske lag
 30 ble tørket med natriumsulfat og renset ved flashkromatografi i
 9:1 metylenklorid:methanol under dannelsen av 2,43 g av for-
 bindelse XIV, 90% av det teoretiske mengde.
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,0 (br x, 2H), 7,52 (d, J=8,6 Hz, 2H),
 7,30 (d, J=8,6 Hz, 2H), 4,62 (s, 2H), 3,45 (s, 2H), 2,9
 35 (s, 4H), 2,75 (t, J=10 Hz, 2H), 2,5 (t, J=10 Hz, 2H),
 2,38-2,10 (m, 2H).
 Anal. beregn. for C₁₆H₁₈N₂O₆: C, 57,49; H, 5,39; N, 8,38.
 Funnet: C, 57,42; H, 5,44; N, 8,29.

Eksempel 23: N-[4-(brommethyl)fenyl]-5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxyl]-5-oxo-pentanamid
(forbindelse XV)

5 Til en løsning av forbindelse XIV (2,9 g, 6 mmol) i
20 ml dimethylformamid ble det tilsatt dibromtrifenylfosforan
(3,04 g, 7,2 mmol). Reaksjonsblandingen ble deretter oppvarmet
til 50°C og ble omrørt i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble der-
etter fortynnet med 1 liter ethylacetat, ekstrahert med 4 x
10 200 ml saltvann og tørket over natriumsulfat. Rensing ved
flashkromatografi, 1:1 ethylacetat:metylenklorid ga 1,20 g av
forbindelse XV, 50% av den teoretiske mengde.
¹H NMR (CDCl₃) δ 8,0 (br s, 1H), 7,50 (d, J=8,6 Hz, 2H),
7,39 (d, J=8,6 Hz, 2H), 4,5 (s, 2H), 2,9 (s, 4H), 2,75
15 (t, J=10 Hz, 2H), 2,5 (t, J=20 Hz, 2H), 2,38-2,10 (m, 2H).
Anal. beregnet for C₁₆H₁₇N₂O₅: C 58,72 H 5,20 N 8,56
Funnet: C 58,66 H 5,24 N 8,50

Eksempel 24: 4-[[5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxyl]-1,5-dioxo-
20 pentyl]amino]-N,N-dimethyl-N-bromidbenzenmethan-
aminiumbromid (forbindelse 7)

Bromidforbindelse XV (1,9 g, 2,5 mmol) ble oppløst i
60 ml metylenklorid etterfulgt av tilsetning av dimethyl-
anilin (1,6 ml, 12,5 mmol). Løsningen ble omrørt i 30 min-
25 utter hvorpå et bunnfall ble dannet, og omrøringen ble
fortsatt i 4 timer. Den dannede suspensjon ble overført til en
skilletrakt og ble ekstrahert med 3 x 30 ml destillert vann.
De kombinerte, vandige vaskeløsninger ble lyofilisert under
dannelse av 1,17 g av produktforbindelse 7, 90% av den teoret-
30 iske mengde ¹H NMR (D₂O) δ 7,60 (s, 5H), 7,38 (d, J=8,6 Hz,
2H), 7,9 (d, J=8,6 Hz, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,62 (s, 6H),
2,9 (s, 4H), 2,75 (t, J=10 Hz, 2H), 2,5 (t, J=10 Hz,
2H), 2,38-2,10 (m, 2H).
Anal. beregnet for C₂₄H₂₈N₃O₅Br: C 55,60 H 5,41 N 8,11
35 Funnet: C 55,67 H 5,39 N 8,07

Eksempel 25: Fremstilling av succinimidyladipoyl- og glutaroylklorider (koblingsmidler)

En løsning av adipinsyremonomethylester (5,4 g, 33,3 mmol) i 15 ml thionylklorid ble oppvarmet til 40°C i 2 timer.

5 Blandingen ble deretter konsentrert og destillert i vakuum (kokepunkt 119°C ved 20 mm Hg) under dannelse av 3,58 g (60% utbytte på vektbasis) av syrekloridmethylesteren. Denne ble oppløst i 20 ml diklormethan, og N-hydroxysuccinimid (2,75 g, 24,0 mmol) ble tilsatt etterfulgt av triethylamin (4,2 ml, 30
10 mmol). Blandingen ble omrørt i 10 minutter og ble deretter fortynnet med ethylacetat og vasket med 0,5M HCl og saltvann. Løsningen ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat, filtrert og konsentrert under dannelse av 4,5 g (87,5% utbytte på vektbasis) av methylsuccinimidyladipat som en fargeløs olje.

15 Proton-NMR i CDCl₃ ved 100 MHz (i forhold til TMS som indre standard): delta 3,73 (singlett, 3H), delta 2,90 (singlett, 4H), 2,70 (multiplett, 2H), 2,37 (multiplett, 2H) og 1,79 (multiplett, 4H).

En løsning av methylsuccinimidyladipat (4,5 g, 17,5
20 mmol), klortrimethylsilan (11,1 ml, 87,5 mmol) og natriumjodid (13,1 g, 87,5 mmol) i 10 ml acetonitril ble oppvarmet til tilbakekokning i 12 timer. Blandingen ble deretter avkjølt til romtemperatur og ble fortynnet med ethylacetat. Reaksjonsblandingen ble vasket gjentatte ganger med 5% vandig natriumbisulfitt inntil den organiske løsning var fargeløs. Den ble
25 deretter vasket med saltvann, tørket over vannfritt magnesiumsulfat, filtrert og konsentrert under dannelse av 3,2 g (71% utbytte på vektbasis) av adipinsyremonosuccinimidylester som et hvitt, fast materiale.

30 Proton-NMR i CDCl₃ ved 100 MHz (i forhold til TMS som indre standard): delta 3,90 (singlett, 4H), 2,70 (multiplett, 2H), 2,4 (multiplett, 2H), 1,80 (multiplett, 4H).

En blanding av adipinsyresuccinimidylester (1,00 g, 3,80 mmol) og thionylklorid (5 ml) ble oppvarmet til 40°C i
35 3 timer, ble deretter avkjølt til romtemperatur og konsentrert i vakuum. Residuet ble omrørt flere ganger med tørr hexan, oljen ble fraskilt og tørket i vakuum under dannelse av 0,97 g (90% utbytte på vektbasis) av succinimidyladipoylchlorid. Dette

ble oppløst i tørt tetrahydrofuran til en 5 molar løsning som ble anvendt som sådan ved fremstilling av forbindelser egnet for kobling til proteinbærere.

Proton-NMR i CDCl_3 ved 100 MHz (i forhold til TMS som indre standard): 3,00 (multiplett, 2H), 2,90 (singlett, 4H), 2,70 (multiplett, 2H), 1,80 (multiplett, 4H).

Succinimidylglutaroylchlorid [5-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyloxy)-5-oxo-pentanoylchlorid] ble på lignende måte fremstilt og anvendt som diskutert i det etterfølgende.

10

VI. Fremstilling av konjugater og inokula

Konjugater av hapteniske ligandmolekyler med proteinbærere slik som albuskjellhemocyanin (KLH) eller kvegserumalbumin (BSA), kan f.eks. fremstilles ved aktivering av bæreren med et koblingsmiddel slik som MBS (m-maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimidester), og kobling til thiolgruppen av den hapteniske ligand. Se f.eks. Liu et al., Biochem., 80, 690 (1979). Som det også er velkjent innen faget, er det ofte gunstig å binde en forbindelse til dens bærer ved hjelp av en intermediær, kjedende gruppe.

Anvendbare bærere er velkjente innen faget og er generelt proteiner i seg selv. Eksempler på slike bærere er albuskjellhemocyanin (KLH), edestin, tyroglobulin, albuminer slik som kvegserumalbumin eller humanserumalbumin (BSA eller HSA), røde blodceller slik som saueerythrocytter (SRBC), tetanus-toxoid, kolera-toxoid så vel som polyaminsyrer slik som poly(D-lysin:D-glutaminsyre), og lignende.

Valget av bærer er mer avhengig av den sluttelige beregnede anvendelse av antigenet enn på determinantdelen av antigenet og er basert på kriterier som ikke spesielt er involvert i foreliggende oppfinnelse. Hvis f.eks. konjugatet skal anvendes i laboratoriedyr, skal en bærer som ikke utvikler en uønsket reaksjon i dette bestemte dyr, velges.

Bærer-haptenkonjugatet oppløses eller dispergeres i en vandig sammensetning av et fysiologisk tolererbart fortynningsmiddel slik som normalt saltvann, PBS eller sterilt vann under dannelsen av et inokulum. En adjuvans slik som Freund's fullstendige eller ufullstendige adjuvans eller alun, kan også

innbefattes i inokulumet. Inokulumet innføres slik som ved injeksjon i dyret anvendt for å danne antistoffene i en mengde tilstrekkelig til å fremkalle antistoffer, noe som er velkjent.

5 Eksempelvis, immunogene konjugater ble fremstilt fra en hapteniske ligand ved tilpasning av deres syntese til å inkorporere en rett kjede av carbonatomer på den hapteniske ligandbenzylgruppe (svarende til den fenoliske del av reaktantligandesteren) som et skillende element som angitt tidligere. Andre eksemplene, immunogene konjugater kan fremstilles som et skillende/kjedende element fra en hapteniske ligand ved tilpasning av disse synteser for å inkorporere den rette kjede av carbonatomer på delen til den hapteniske ligand svarende til syredelen av reaktantliganden.

15 Det ble konkludert med at den fleksible carbonkjede av et adipat- eller glutaratvedheng vil redusere enhver tilbøyelighet til immunreaktivitet på grunn av den strukturmessige bundethet pålagt ved kovalent binding til bærerproteinet. Det bifunksjonelle reagens fremstilt for dette formål, avleverer også den preaktiverte carboxylgruppe for binding via amidbindingsdannelse med lysinrestene av bæreren. Den bestemte koblingsmetode som ble anvendt i denne studie, er ytterligere beskrevet her. De hapteniske ligander ble koblet til albumskjellhemocyanin (KLH) gjennom en aminogruppe av den fenoliske del av strukturen.

 Ifølge foreliggende oppfinnelse er det intermediære bindingsmiddel fortrinnsvis succinimidyladipoyl- eller glutaroylchlorid som ble fremstilt som diskutert tidligere. Et antigent (immunogent) konjugat ble fremstilt som følger.

30 I en eksempelvis prosedyre ble 2,5 mg av et ovenfor angitt reaksjonsprodukt av haptene og succinimidyladipoylchlorid eller succinimidylglutaroylchlorid i 250 µl dimetylformamid langsomt tilsatt under omrøring til 2 mg KLH i 750 µl av 0,01M natriumfosfatbuffer ved en pH-verdi på 7,2. En temperatur på 35 4°C anvendes, og den resulterende blanding omrøres i ca. 1 time under dannelsen av det haptenkjedede KLH-konjugat. Det således dannede konjugatreaksjonsprodukt renses deretter på vanlig måte.

VII. Fremstilling av monoklonale reseptorer

De foregående KLH-konjugater (ca. 100 µg) ble anvendt for å immunisere grupper av fire 8 uker gamle mus (129G1X⁺-stamme) ved intraperitoneal (IP) injeksjon i Freund's fullstendige adjuvans. En ytterligere IP-injeksjon av 50 µg konjugat i alun ble gitt to uker deretter. Én måned deretter ble musen med den høyeste antistofftiter mot haptenet injisert intravenøst med 50 µg av KLH-konjugatet. Miltene ble tatt ut tre dager deretter for fremstilling av hybridomer of monoklonale antistoffer.

Monoklonale antistoffer ble erholdt som beskrevet av Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 4524 (1980) og Niman et al., i Monoclonal Antibodies and T-Cell Products, red., Katz, D.H., 23-51 (CRC Press, Boca Raton, FL 1982). Kort angitt, ble miltceller (1×10^8) fusjonert med $2,0 \times 10^7$ Sp2/O myelomceller. Celler ble anbrakt i 45 96-brønns plater idet hver brønn inneholdt 150 µl HAT-DMEM-medium ytterligere inneholdende 1% nutridoma og 2% BSA. Lymfocytene anvendt for å danne hybridomene ifølge oppfinnelsen, kan være avledet fra et hvilket som helst pattedyr slik som en primat, gnager (f.eks. mus eller rotte), kanin, marsvin, ku, hund, sau, gris eller lignende. Hvis hensiktsmessig, kan verten sensibiliseres ved injeksjon med immunogenet, i dette tilfelle en hapteniske ligand, etterfulgt av en booster-injeksjon, og deretter isolering av milten.

Det foretrekkes at myelomcellelinjen er fra den samme art som lymfocytene. Derfor anvendes typisk fusjonerte hybrider slik som muse-musehybrider [Shulman et al., Nature, 276, 269 (1978)] eller rotte-rottehybrider [Galfre et al., Nature, 277, 131 (1979)]. Imidlertid har enkelte rotte-musehybrider også med hell vært anvendt ved dannelsen av hybridomer [Goding, "Production of Monoclonal Antibodies by Cell Fusion", i Antibody as a Tool, Marchalonis et al., red., John Wiley & Sons Ltd., s. 273 (1982)]. Egnede myelomlinjer for anvendelse i foreliggende oppfinnelse innbefatter MPC-11 (ATCC CRL 167), P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580), Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 1581), P3 X 63 Ag8U.1 (ATCC CRL 1597), Y3-Ag1.2.3. (deponert ved Collec-

tion Nationale de Cultures de Microorganisms, Paris, Frankrike, nr. I-O78) og P3X63Ag8 (ATCC TIB 9). Den ikke-utskillende, murine myelomlinje Sp2/O eller Sp2/O-Ag14 er foretrukket for anvendelse i foreliggende oppfinnelse.

5 De hybridomceller som sluttelig fremstilles, kan dyrkes ved å følge vanlige in vitro vevdyrkningsteknikker for slike celler, noe som er velkjent. Mer fordelaktig dyrkes hybridomcellene i dyr under anvendelse av lignende velkjente teknikker hvor de monoklonale reseptorer erholdes fra den
10 ascitesvæske som således dannes. Dyrene anvendt for dannelsen av ascitesvæskene, var Balb/c x 129G1X⁺-mus avlet i musekolonien til Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, California, men når dyr som er forskjellige fra mus anvendes for fremstilling av hybridomene, kan mus eller denne
15 dyretype anvendes for fremstilling av ascitesvæske.

I særdeleshet ble en eksempelvis monoklonal reseptor fremstilt ved standard hybridomteknologien ifølge Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975). Spesifikt ble 129G1X⁺-mus immunisert ved intraperitoneal injeksjon med et inokulum på 100 µg
20 konjugat (f.eks. forbindelse 1a, 2 eller 5a bundet til KLH) i 300 µl av en 1:1 blanding av fosfatbufret saltvann (PBS), pH 7,4, og Freund's fullstendige adjuvans. To uker senere ble musene igjen injisert på lignende måte med 50 µg av det foregående konjugat i 300 µl av en 1:1 blanding av PBS (pH 7,4) og
25 10 mg/ml alun. Etter ytterligere 8 uker ble musene immunisert intravenøst med 50 µg av konjugatet i 200 µl PBS (pH 7,4). Miltene ble fjernet fra musene 4 dager senere, og miltcellene ble fusjonert til myelomceller.

Miltcellene ble ansamlet, og en enkel celleduspensjon
30 ble fremstilt. Kjernedannede miltceller ($1,4 \times 10^8$) ble deretter fusjonert med 3×10^7 Sp2/O ikke-utskillende myelomceller i nærvær av en celleduspensjonsaktivator (polyethylenglycol 2000). Det hybridom som produserer et bestemt monoklonalt antistoff, ble utvalgt ved såing av hybridomcellene i 96-brønns plater og
35 ved dyrkning i Dulbeccos modifiserte Eagle-medium (DMEM) inneholdende 4500 mg/l glucose (10%), 10% kalvefosterserum (FCS), hypoxanthin, aminopterin og thymidin (dvs. HAT-medium) som ikke understøtter vekst av ufusjonerte myelomceller.

Etter to til tre uker ble supernatanten over celleklonen i hver brønn samlet og testet ved en ELISA-bestemmelse (enzymkjedet immunosorbentbestemmelse som beskrevet i det etterfølgende) med hensyn til nærvær av antistoffer mot forbindelse 1a, 2 eller 5 som antigener. Hver haptensisk ligand ble konjugert til BSA for ELISA-bestemmelsene. Positive brønner ble klonet to ganger ved begrensede fortygning. De kloner som fortsatte å produsere forbindelse 1a- eller 2-spesifikt antistoff etter to kloninger, ble utvidet til å produsere større volumer av supernatantvæske.

7 av de 23 monoklonale reseptorer (ca. 30%) som immunreagerte med forbindelse 1a, hydrolyserte reaktantligandesterforbindelse 3 katalytisk. Hver av disse katalyser kunne inhiberes av en egnet haptensisk ligand slik som forbindelse 1b. Således var en relativt høy prosent av fremkalte, monoklonale reseptorer i stand til å katalysere en esterolytisk reaksjon. Ingen av de 21 antistoffer fremkalt av haptensforbindelse 2, utviste katalytisk aktivitet mot reaktantligandforbindelse 3. På lignende måte ble kolonier som opprinnelig produserte antistoffer som bandt forbindelser 5a, 6 eller 7, subklonet to ganger, hvoretter atten for forbindelse 5a, tjueto for forbindelse 6 og tjueseks for forbindelse 7 forble aktive. Disse antistoffer var av IgG-klassen.

Monoklonale, katalytiske molekyler ble utfelt fra ascitesvæskene dyrket i pristanbehandlete Balb/c x 129G1X⁺-mus med salt, ble rensert ved anionbytterkromatografi (DEAE) etterfulgt av affinitetskromatografi (protein G) og dialysert i 50 mM fosfat (100 mM NaCl, pH 7,5). Antistoffer ble bedømt å være homogene (95%) ved natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgellelektroforese.

Ett av hybridomene, betegnet 30C6, ble studert ytterligere og er blitt deponert ved American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. Dette hybridom ble deponert 24. januar 1990 og mottok deponeringsnr. HB 10341. To andre hybridomer 27A6 og 57G11 ble på lignende måte deponert ved ATCC 11. desember 1990 og mottok deponeringsnr. HB 10621 og HB 10622.

Foreliggende deponeringer ble foretatt i overensstem-

melse med Budapesttraktatens krav om at varigheten av deponeringen skal være 30 år fra deponeringsdatoen eller 5 år etter den siste henvendelse for deponering ved deponeringsstedet eller for levetiden av et US-patent som utgår fra denne søknad, som er den lengste. Hybridomene vil bli erstattet hvis de skulle bli ikke-levedyktige ved deponeringsstedet.

En monoklonal reseptor ifølge oppfinnelsen kan også fremstilles ved innføring, slik som ved injeksjon, av hybridomet inn i det peritoneale hulrom av et pattedyr slik som en mus. Fortrinnsvis anvendes som allerede angitt, syngeniske eller semi-syngeniske pattedyr slik som i US patentskrift 4 361 549, hvis beskrivelse er inkorporert her ved referanse. Innføringen av hybridomet forårsaker dannelse av antistoffproduserende hybridomer etter en egnet vekstperiode, f.eks. 1-2 uker, og resulterer i en høy konsentrasjon av den reseptor som fremstilles, slik at den kan gjenvinnes fra blodstrømmen og peritonealt eksudat (ascites) fra vertmusen. Selv om vertmusen også har normale reseptorer i sitt blod og ascites, er konsentrasjonen av normale reseptorer typisk bare ca. 5% av den av den monoklonale reseptorkonsentrasjon.

Den monoklonale reseptor som er til stede i hybridom-supernatanten, kan anvendes uten rensing, eller reseptoren kan gjenvinnes fra ascites eller serum fra musen under anvendelse av standardteknikker slik som affinitetskromatografi under anvendelse av AD 169-infiserte celler bundet til en immunosorbant slik som "Sephacel" 6B eller 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), etterfulgt av eluering fra immunosorbanten under anvendelse av en syrebuffer slik som glycinhydroklorid ved en pH-verdi på ca. 2,5.

I foreliggende studier ble IgG-fraksjoner typisk holdt fra museascites ved utfelling med 45% mettet ammoniumsulfat etterfulgt av kromatografi på DEAE-"Sephacel" med natriumklorideluering som angitt tidligere. Fraksjonen som ble eluert med 100 mM salt, ble dialysert og konsentrert.

VIII. Enzymkjedet immunosorbentbestemmelse (ELISA)

Bindingen av ligander og effekten av kjemisk modifisering ble undersøkt ved ELISA med antistoff ved en fastsatt

konsentrasjon i området for dets titer og varierende reagens eller ligandkonsentrasjon. Inhibering er rapportert hvis titeren reduseres med 50% ved mindre enn et 1000:1 forhold mellom reagens og hapten.

5 Bestemmelser ble utført i flatbunnede polyvinylmikrotiterplater (Dynatech, Alexandria, VA). Illustrativt ble veggene belagt med en løsning omfattende forbindelse 1a bundet til BSA som antigenliganden i fosfatbufret saltvann (PBS) under anvendelse av 50 µl løsning pr. brønn. Ligander ble be-
10 lagt til 1 µg pr. ml. Platene ble deretter inkubert over natten ved 37°C i en tørr ovn. De tørrede plater ble lagret ved 4°C inntil bruk. Før ELISA-bestemmelsen ble tørrede plater rehydratisert ved to vaskinger på 2 minutter hver med 10 millimolar (mM) PBS, pH 7,4, inneholdende 0,1% polyoxyalkylen
15 (20) sorbitanmonolaurat ("Tween 20") og 0,02% "Thimerosal" (natriummethyalkvikksølvthiosalicylat), (Sigma, St. Louis, MO).

For å redusere ikke-spesifikk binding ble hybridom-supernatantene fortynnet 1:2 i vaskebuffer inneholdende 0,1% BSA som fortynningsmiddel. 50 µl av fortynnede hybridom-supernatanter ble deretter tilsatt til hver brønn og inkubert i
20 1 time ved 4°C på en gyrorister for å bringe den monoklonale, antistoffholdige supernatant i kontakt med bundet forbindelse 4. Etter to vaskinger hver på 2 minutter ble 50 µl peroksydase-merket geite-anti-muse-IgG + IgM (Tago, Burlingame, CA), fortynnet 1:1000, tilsatt til hver brønn, og reaksjonsblandingen
25 ble inkubert ved 4°C i 1 time for å binde det merkede antistoff til bundet, monoklonalt antistoff.

Substratet anvendt for å bestemme bundet peroksydaseaktivitet, ble fremstilt like før bruk og besto av 400 µg/ml
30 o-fenylendiamin (Sigma, St. Louis, MO) i 80 mM citrat-fosfatbuffer, pH 6,0, inneholdende 0,12% H₂O₂. Etter to sluttelige vaskinger ble 50 µl substratløsning tilsatt til hver brønn, og fargen fikk utvikles i 15 minutter i mørket. Fargeutviklingen ble stanset ved tilsetning av 25 µl 4 molar (M) H₂SO₄ til hver
35 brønn, og den optiske densitet ved 492 nanometer (nm) ble målt med en "Multiskan" ELISA-plateleser.

IX. Kinetiske målinger

Rensede, monoklonale antistoffer ble dialysert mot EPPS-buffer (1 mM, pH 8,0, 100 mM NaCl) eller CHES-buffer (1 mM, pH 8,0, 100 mM NaCl). Dens proteinkonsentrasjon ble bestemt ved BCA-metoden (Pierce). Bestemmelser ble utført ved HPLC (revers-fasekolonne, C₁₈, "Vydac 201TP54") med CH₃CN/H₂O (0,1% TFA) på et isokratisk program på 10/90. En indre standard av o-acetamidofenol ble anvendt for å beregne mengden av dannet produkt [4-(carboxybutyramido)fenol].

Antistofflagerløsninger ble fortynnet i 1 ml av den egnede buffer [50 mM, EPPS (pH 7,2-8,6); CHES (pH 8,6-10,0), 100 mM NaCl] under dannelse av en sluttelig proteinkonsentrasjon på 20 µM. Reaksjoner inneholdt 5% koløsningsmiddel dioxan, og temperaturen ble opprettholdt ved 37 ± 0,1°C. De opprinnelige, lineære hastigheter ble målt ved <5% hydrolyse av det totale substrat. Antistoffer som ble testet, ble funnet å være stabile i minst 48 timer under reaksjonsbetingelsene som bestemt ved ELISA-bindingsbestemmelser. De observerte hastigheter ble korrigert for den ukatalyserte hydrolysehastighet i fravær av antistoff. Kinetiske parametre V_{maks} , K_m ble bestemt ved ikke-lineær minste kvadraters tilpasning av den opprinnelige hastighet versus substratkonsentrasjon til en hyperbolisk kurve beskrevet av Michaelis-Menten-ligningen.

Variasjonen av opprinnelige hastigheter som en funksjon av pH ble målt i CHES (50 mM) (100 mM NaCl) ved en pH-verdi over 8,6 og i EPPS (50 mM) (100 mM NaCl) ellers. Det var ingen forskjell i de observerte hastigheter med antistoff 27A6 når det ble testet ved pH 8,6 i EPPS og CHES (50 mM) (100 mM NaCl). Variasjon av bufferionkonsentrasjonen (12,5-50 mM) viste ingen avhengighet av K_{kat} , (antistoff 27A6) av nærvær av bufferarter.

Ligning 1 beskriver pH-hastighetsprofilen erholdt for hydrolysehastigheten (K_{obsd}) av forbindelse 3 ekstrapolert til null-bufferkonsentrasjon. Bruice et al. Bioorganic Chemistry, vol. 1; Benjamin: New York (1965).

$$K_{obsd} = K_{OH} [OH^-]$$

Kurven for fylte kvadrater (figur 3b) ble utviklet ved å vari-

ere konsentrasjonen av buffer (12,5 mM-50 mM) ved en fastsatt konsentrasjon av forbindelse 3 (400 μ M) over pH-området 7,2-10,0. De anvendte buffere og deres pH-område som ble testet, var nøyaktig det samme som beskrevet ovenfor. Verdien for K_{OH} -
5 kan beregnes fra helningen av en kurve av K_{obs} versus K_w/a_H .

X. Kjemisk modifisering av antistoffer

(a) Fenylglyoxal; en 50 μ l aliquot av en fenylglyoxalløsning (6 mM), (125 mM $NaHCO_3$, pH 7,5) ble tilsatt til
10 195 μ l buffer, (125 mM, pH 7,5 $NaHCO_3$), inneholdende 20 μ M antistoff. Blandingen ble ristet og fikk stå i 1 time ved romtemperatur. Denne reaksjonsblanding ble deretter overført til en mikrodialysator (Pierce) og dialysert med 125 mM, pH 7,5 $NaHCO_3$ med en gjennomstrømning på ca. 150 ml/time i 2 timer.
15 Mikrodialysatoren ble deretter spylt med 4 x 60 ml porsjoner av pH 8,4, 50 mM CHES, 100 mM NaCl og fikk stå i denne buffer over natten (ca. 15-18 timer). Mikrodialysatoren ble igjen spylt med 3 x 50 ml porsjoner av pH 8,4, 50 M CHES, 100 mM NaCl neste morgen. Prøvene ble fjernet, proteinkonsentrasjoner
20 ble beregnet på nytt (BCA), og bestemmelser ble utført med hensyn til katalytisk aktivitet (HPLC) eller binding (ELISA). En lignende prosedyre ble anvendt med tilstedeværende hapten (200 μ M).

(b) Maleinsyreanhydrid; en 5 ml aliquot av en maleinsyreanhydridløsning (0,06 M, dioxan) ble tilsatt til 299 μ l 20
25 mM, pH 8,9 borat, 100 mM NaCl inneholdende 20 μ M antistoff. Løsningen ble ristet og fikk stå ved romtemperatur i 1 time. Denne reaksjonsblanding ble deretter overført til en mikrodialysator og ble dialysert som beskrevet ovenfor med 50 mM CHES,
30 pH 8,4, 100 mM NaCl. Prøver ble fjernet, proteinkonsentrasjoner ble beregnet (BCA), og bestemmelser ble utført med hensyn til katalytisk aktivitet eller binding.

(c) Diethylpyrocarbonat; 10 μ l av en 0,6 M diethylpyrocarbonatløsning i ethanol ble fortynnet i 1 ml natriumacetat (NaOAc) (150 mM, pH 6, 100 mM NaCl). 5 μ l av denne løs-
35 ning ble tilsatt til 299 μ l NaOAc (150 mM, pH 6,0, 100 mM NaCl) inneholdende 20 μ M antistoff. Blandingen ble ristet og fikk stå ved 4°C over natten (ca. 15-18 timer). Denne reak-

sjonsblanding ble deretter overført til en mikrodialysator og dialysert som beskrevet ovenfor med CHES (50 mM, pH 8,4, 100 mM NaCl). Prøver ble fjernet, proteinkonsentrasjoner ble bestemt (BCA), og bestemmelser ble utført med hensyn på katalytisk aktivitet og binding.

10

P a t e n t k r a v

1. Antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, hvor det antistoffkombinerende sete av angitte molekyler binder til:

(a) en reaktantligand inneholdende den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres; og

(b) en haptenisk ligand strukturelt analog med angitte reaktantligand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe så vel som til et mettet carbonatom ved en stilling i den hapteniske ligand svarende til stillingen av carbonylgruppen så vel som til det carbonylbundne heteroatom av den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken haptenisk ligand ytterligere innbefatter en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier, og hvor den ioniske, ladningsbærende gruppe er fraværende fra en tilsvarende stilling på angitte reaktantligand og lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7 Ångstrøm fra angitte, tetraedriske carbonatom.

2. Molekyler ifølge krav 1 hvori angitte, ioniske, ladningsbærende gruppe er bundet indirekte til angitte, tetraedriske carbonatom med minst ett atom som separerer angitte, tetraedriske carbonatom fra atomet av angitte, ladningsbærende gruppe som bærer den ioniske ladning.

3. Molekyler ifølge krav 1 som er monoklonale anti-stoffer.

5 4. Molekyler ifølge krav 1 hvori angitte, hapteniske ligand inneholder et ammoniumion eller et carboxylation ved fysiologiske pH-verdier som angitte, ioniske, ladningsbærende gruppe.

10 5. Monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, hvor det antistoffkombinerende sete av angitte molekyler binder til:

15 (a) en reaktantligand inneholdende den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken reaktantligand er representert ved strukturen



hvori R^1 og R^2 betegner carbonatomholdige, kjemiske rester av reaktanten, og

25 -X- er -O- eller -NR³-, hvori R^3 er hydrogen eller en tredje carbonholdig, kjemisk rest; og

(b) en haptenisk ligand som er strukturelt analog med angitte reaktantligand, hvilken haptenisk ligand er representert ved strukturen



35 hvori $\text{R}^{1'}$ og $\text{R}^{2'}$ betegner carbonatomholdige rester som er strukturelt analoge med R^1 og R^2 , og hvor minst én av $\text{R}^{1'}$ og $\text{R}^{2'}$ inneholder en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig løsning ved fysiologiske pH-verdier, minst én av angitte grupper som tilveiebringer ionisk ladning ved fysiologiske pH-verdier,

er lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på



- 5 ca. 7 Ångström fra angitte -CH-gruppe av angitte struktur, og
 hvor $R^{3'}$ er H når -X- er -O-, eller hvor $R^{3'}$ er strukturelt
 analog med R^3 når -X- er -NR³-.

6. Molekyler ifølge krav 5, hvori -X- er -O-.
- 10

7. Molekyler ifølge krav 6, hvori angitte gruppe som
 bærer en ionisk ladning ved fysiologiske pH-verdier, er et
 ammoniumion eller et carboxylation.
- 15

8. Molekyler ifølge krav 7 som utskilles av hybridom
 3OC6 med ATCC deponeringsnr. HB 10341.

9. Molekyler ifølge krav 7 som utskilles av hybridom
 20 27A6 med ATCC deponeringsnr. HB 10621.

10. Molekyler ifølge krav 5 hvori angitte, ioniske, lad-
 ningsbærende gruppe er bundet indirekte til angitte, tetra-
 edriske carbonatom med minst ett atom som separerer angitte,
 25 tetraedriske carbonatom fra atomet til angitte, ladnings-
 bærende gruppe som bærer den ioniske ladning, og hvori an-
 gitte, ioniske, ladningsbærende gruppe er lokalisert innen et
 sfærisk volum definert ved en radius på ca. 2 til ca. 5 Ång-
 ström fra angitte, tetraedriske carbonatom.
- 30

11. Celler som når de dyrkes i et medium, danner mono-
 klonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende anti-
 stoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd
 valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reak-
 35 tantligand katalytisk, hvor det antistoffkombinerende sete av
 angitte molekyler binder til:

- (a) en reaktantligand inneholdende den på forhånd
 . valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolys-

eres; og

(b) en haptenisk ligand strukturelt analog med angitte reaktantligand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe så vel som til et mettet carbonatom ved en stilling i den hapteniske ligand svarende til stillingen av carbonylgruppen, så vel som til det carbonylbundne heteroatom, av den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken haptenisk ligand ytterligere innbefatter en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier, hvilken ionisk ladningsbærende gruppe er fraværende fra angitte reaktantligand og lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7 Ångstrøm fra angitte, tetraedriske carbonatom.

12. Celler ifølge krav 11 som er hybridomceller som ytterligere utskiller i dyrkningsmediet angitte, monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoff omfattende setedeler som hydrolyserer angitte, på forhånd valgte carboxylsyreamid eller esterbinding katalytisk.

13. Hybridomceller ifølge krav 12 som er de av hybridom 3OC6 med ATCC deponeringsnr. HB 10341.

14. Hybridomceller ifølge krav 12 som er de av hybridom 27A6 med ATCC deponeringsnr. HB 10621.

15. Metode for katalytisk hydrolisering av en på forhånd valgt ester- eller amidbinding i et raktivt ligandmolekyl omfattende trinnene:

(a) blanding av en katalytisk effektiv mengde av de monoklonale antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler ifølge krav 1 med angitte reaktantligandmolekyler i et vandig medium under dannelse av en reaksjonsblanding; og

(b) opprettholdelse av angitte reaksjonsblanding i et tidsrom tilstrekkelig til at angitte reaktantligandmolekyler binder til angitte antistoffmolekyler eller molekyler

inneholdende antistoffkominerende setedeler, og til at angitte antistoffmolekyler eller molekyler innehldende antistoffkombinerende setedeler derav får hydrolysere angitte på forhånd valgte binding katalytisk og danne produkter.

5

16. Metode ifølge krav 15 hvori angitte antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler derav, er utskilt av hybridom 3OC6 med ATCC deponeringsnr. HB 10341 eller hybridom 27A6 med ATCC deponeringsnr. HB 10621.

10

17. Metode for fremstilling av celler som når de dyrkes i et medium, danner antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer en på forhånd valgt carboxylsyreamid- eller esterbinding av en reaktantligand katalytisk, omfattende trinnene:

15

(a) immunisering av et dyr med et immunogen som innbefatter en hapteniske ligand som inneholder et tetraedrisk carbonatom bundet til en hydroxylgruppe så vel som til et mettet carbonatom ved en stilling i den hapteniske ligand svarende til stillingen av carbonylgruppen, så vel som til det carbonylbundne heteroatom, av den på forhånd valgte carboxylsyreamid- eller esterbinding som skal hydrolyseres, hvilken hapteniske ligand ytterligere innbefatter en gruppe som bærer en ionisk ladning i vandig oppløsning ved fysiologiske pH-verdier hvor den ioniske, ladningsbærende gruppe er fraværende fra en tilsvarende stilling av angitte reaktantligand og lokalisert innen et sfærisk volum definert ved en radius på ca. 7 Ångstrøm fra angitte tetraedriske carbonatom;

25

(b) opprettholdelse av angitte dyr i et tidsrom tilstrekkelig til at det angitte dyr får utskille antistoffer som immunreagerer med angitte, hapteniske ligand;

30

(c) overføring av gener som koder for antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra antistoffproduserende celler av angitte, opprettholdte, immuniserte dyr fra trinn (b) i vertceller under dannelse av hybridceller som inneholder gener fra minst to kilder, og hvilke dannede hybridceller (i) produserer anti-

35

stoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra angitte, overførte gener når de dyrkes, og (ii) kan dyrkes hovedsakelig ubegrenset;

(d) dyrkning av hybridcellene i et egnet dyrkningsmedium i et tidsrom tilstrekkelig til at disse hybridceller får produsere antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler;

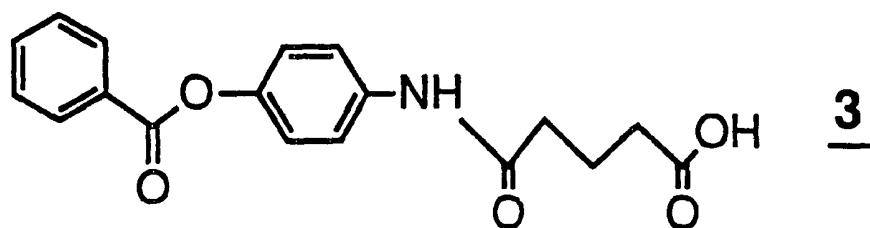
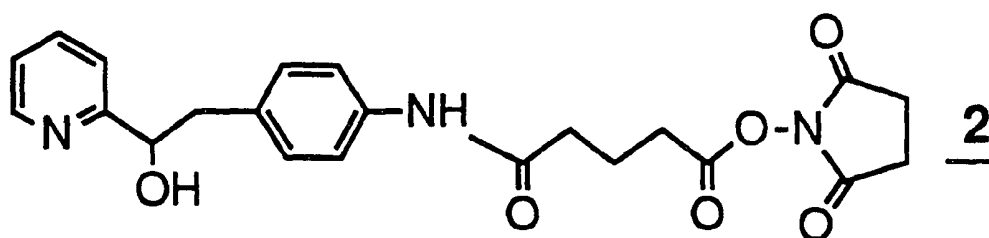
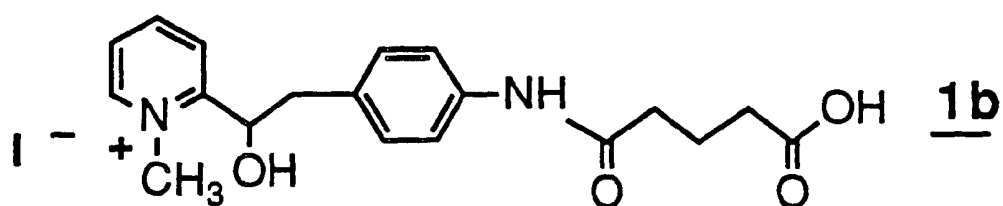
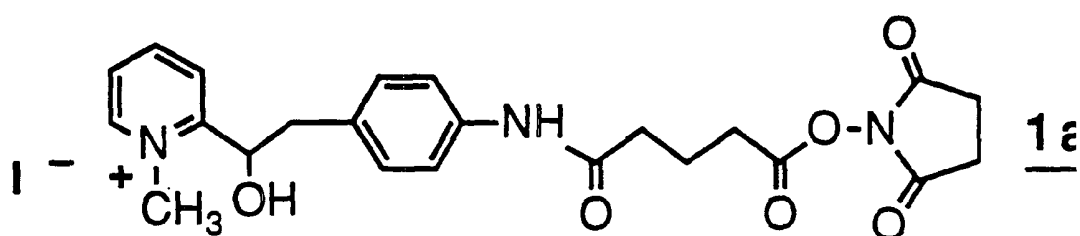
(e) gjenvinning av antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler fra de dyrkede hybridceller;

(f) screening av de erholdte antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler for å identifisere en hybridcelle som produserer antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer angitte på forhånd bestemte carboxylsyreamid- eller esterbinding katalytisk; og

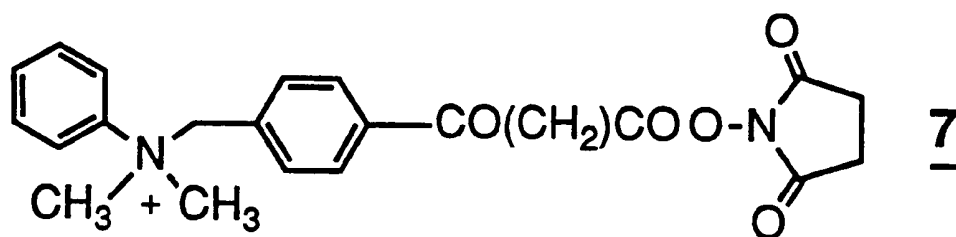
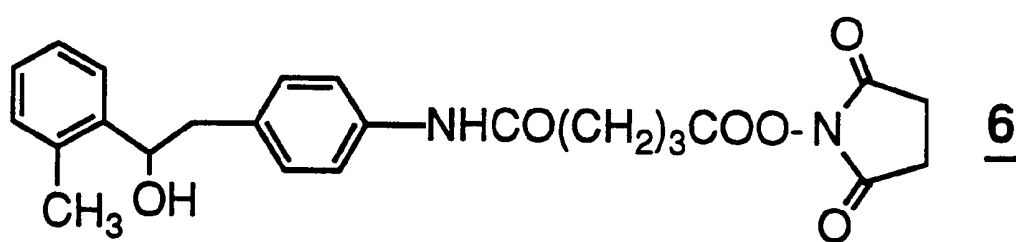
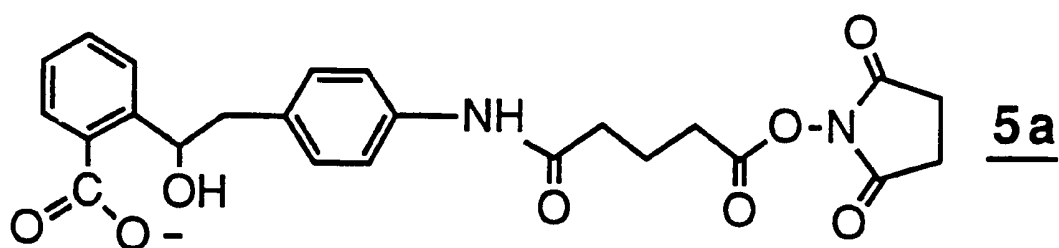
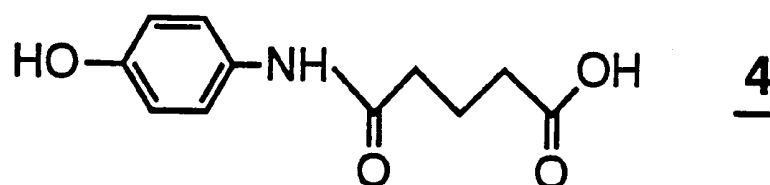
(g) dyrkning av kloner av angitte, identifiserte hybridcelle som produserer antistoffmolekyler eller molekyler inneholdende antistoffkombinerende setedeler som hydrolyserer angitte på forhånd bestemte carboxylsyreamid- eller esterbinding.

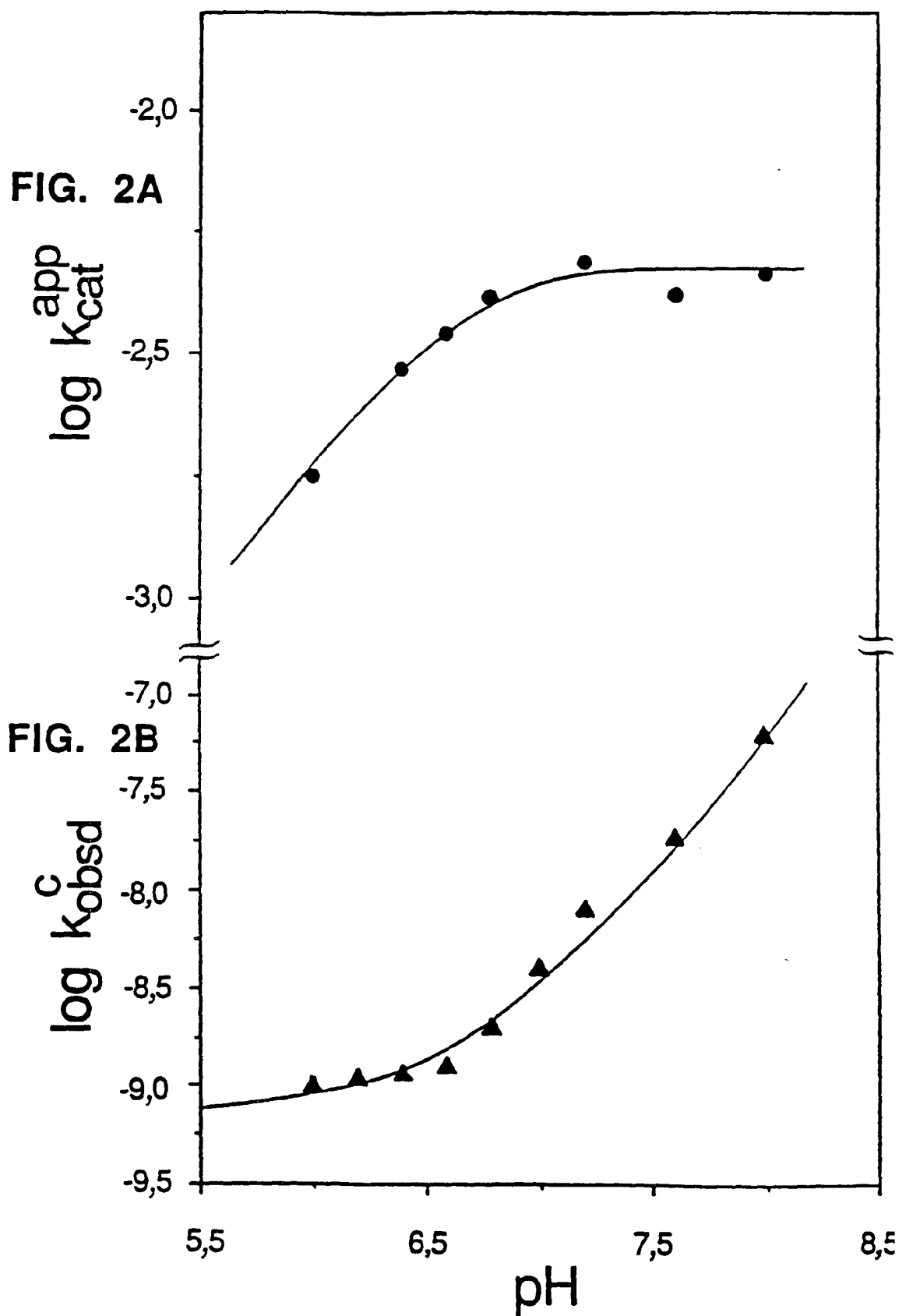
18. Metode ifølge krav 17 hvori cellene dannet i trinn (c), er hybridomceller.

1/4

FIGUR 1**FIG. 1A**

2/4

FIG. 1B

FIGUR 2

FIGUR 3