



УДК 547.458.41.057

РЕЦЕПТОРЫ СЕЛЕКТИНОВ. 5*. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К СИНТЕТИЧЕСКИМ АНТИГЕНАМ SiaLe^a И SiaLe^x

© 1996 г. Е. В. Власова, М. М. Ворожайкина, Л. С. Хральцова,
А. Б. Тузиков, И. С. Попова, Ю. Е. Цветков*, Н. Э. Нифантьев*, Н. В. Бовин[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Поступила в редакцию 02.11.95 г.

Используя полностью синтетические иммуногены, получили пять моноклональных антител (МА) класса IgM к тетрасахариду SiaLe^a, известному как серологический опухолевый маркер СА 19.9, а также три МА (одно IgG3 и два IgM) к тетрасахариду SiaLe^x – антигену дифференцировки CD15s. С помощью широкого набора олигосахаридов и их полиакриламидных конъюгатов определили эпиптопную специфичность полученных антител. МА 4E10 к SiaLe^a и МА 4G5 к SiaLe^x оказались высокоспецифичными к заданному при иммунизации антигену, т.е. не взаимодействовали ни с близкими по структуре и конформации олигосахаридами, ни с их дисахаридными фрагментами. Два МА (D7 и E5B1), полученные к SiaLe^a, показали слабую перекрестную реакцию с SiaLe^x. МА СС1 практически одинаково узнавало как SiaLe^a, так и SiaLe^x, а МА 5H9 к SiaLe^a давало перекрестную реакцию с несиалированной формой – трисахаридом Le^a. МА А3 и В11, полученные к SiaLe^x, связывались со всеми углеводными структурами, имеющими коровий дисахарид Galβ1-3(4)GlcNAc.

Ключевые слова: моноклональные антитела, синтетические иммуногены, SiaLe^a, SiaLe^x, углеводные опухолевые маркеры, СА 19.9, CD15s.

Некоторые из группоспецифических антигенов системы Льюис (Le) рассматриваются как ранние маркеры ряда опухолей эпидермального происхождения [2–6]; повышенный по сравнению с нормальным состоянием синтез антигенов SiaLe^x и SiaLe^a связывают с инициацией клеточной адгезии при развитии воспалительных реакций и иммунного ответа [7–9]. Детерминанты SiaLe усиленно экспрессируются на мембранах клеток метастазирующих опухолей [10, 11]; кроме того, в составе муцинов и гликолипидов они попадают в среду, омывающую опухолевые клетки [12, 13], и в кровяное русло [14–17].

Олигосахарид SiaLe^a (NeuAcα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAc), или опухолевый маркер СА 19.9, – детерминанта, выявляемая при серологической диагностике рака поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта [10, 18, 19]. Моноклональные антитела (МА), используемые в на-

стоящее время для иммунохимического выявления СА 19.9, были получены к нативным клеткам различных опухолей или клеточных линий [14, 20–23]. При изучении “тонкой” углеводной специфичности было обнаружено, что большинство из этих МА дают перекрестные реакции с родственными углеводными структурами – с тетрасахаридом SiaLe^x (МА ST-4-39, Co12.11 и HECA-452), с трисахаридами Le^a (МА Co29.11 и СС3С195), Le^x (МА MSW113) или NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAc (МА СА50) [11, 17, 23–25]. Судя по литературным данным, только два МА (CSLEA-1 и С 242), которые узнают тетрасахарид SiaLe^a, практически не дают перекрестных положительных реакций с сывороткой здоровых доноров [13, 15, 17, 18].

Тетрасахарид SiaLe^x (NeuAcα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc) определен в 1976 г. в составе гликолипида клеток почек человека [2]. Первые МА к SiaLe^x (CSLEX-1, FH-6 и SNH3) были получены к нативным клеткам или белковой фракции клеток аденокарциномы желудка [2, 7, 26–30]. Интересно, что эти три МА узнавали разные эпиптопы и только первое из них не давало перекрестных

* Сообщение 4 см. [1].

Сокращения: Sug – спейсерированный гаптен, РАА – полиакриламид, PE – фосфатидилэтаноламин.

Автор для переписки.

реакций с близкородственными структурами. Иммуногистохимические исследования показали, что SiaLe^x и элонгированный олигосахарид SiaLe^xLe^x выявляются на поверхности раковых клеток желудочно-кишечного тракта [31, 32] и метастазах карциномы кишечника в печень [2, 33]. Однако основной интерес к этому тетрасахариду обусловлен тем, что SiaLe^x является общей структурой, с которой связываются E-, P- и L-селектины – Ca²⁺-зависимые лектины суперсемейства иммуноглобулинов, опосредующую клеточную адгезию при воспалении и метастазировании [8, 32, 34]. Интересно, что, хотя на природных рецепторах селективных представлен только тетрасахарид SiaLe^x, его изомер SiaLe^a со всеми селектинами связывается значительно сильнее.

Чтобы изучать с помощью иммунохимических подходов появление и функционирование молекул с терминациями SiaLe^a и SiaLe^x, необходимы моноклональные антитела, узнающие строго один из этих тетрасахаридов, а также не дающие перекрестных реакций с близкородственными антигенами Le^a, Le^x, Le^c, Galβ1-4GlcNAc, сиалиллактозаминами, сульфатированными Le и другими детерминантами, широко представленными на поверхности клетки и в составе гликокаликса (структуру антигенов см. в таблице). В то же время тетрасахариды SiaLe^a и SiaLe^x очень близки структурно и конформационно, что предопределяет уже отмеченные перекрестные реакции многих из описанных ранее антител. Поэтому в данной работе мы использовали синтетические антигены как на стадии иммунизации, так и на стадии скрининга гибридом – подход, позволивший ранее получить МА с абсолютной специфичностью к другому углеводному антигену – Le^y [35].

Для получения МА в качестве иммуногена использовали синтетические конъюгаты Sug-РАА-РЕ [36, 37] (Sug – спейсерированный гаптен SiaLe^a или SiaLe^x, РАА – водорастворимый полиакриламид, РЕ – фосфатидилэтанолламин; содержание Sug и РЕ – по 15 мольн. %). РАА является иммунологически инертным носителем (антитела к нему не образуются), РЕ благодаря гидрофобности придает конъюгату способность встраиваться в мембраны. Для получения эффективного иммунного ответа конъюгат сорбировали на поверхности бактерий *Salmonella minnesota* (мутантный штамм R595, дефицитный по углеводам) и вводили внутривенно мышам линии Balb/c пятикратно через 10–12 сут.

При определении величины иммунного ответа методом прямого иммуноферментного анализа (ИФА) выяснилось, что реакция животного как на тетрасахарид SiaLe^a (титр сыворотки 1 : 600), так и на тетрасахарид SiaLe^x (титр сыворотки лишь вдвое превышал фоновый) значительно ниже,

чем иммунный ответ при иммунизации мышей антигеном Le^y, когда титр сыворотки был равен 1 : 8000 [35]. Возможно, это связано с предполагаемым [1] супрессивным действием гликоконъюгатов, содержащих тетрасахариды SiaLe. Косвенным доказательством этого явления может служить тот факт, что большинство известных антител к этим антигенам принадлежит к иммуноглобулинам класса М.

Гибридомы получали по классической методике [38], для слияния с клетками мышьиной миеломы X-63.8.Aza были выбраны животные с максимальным ответом на соответствующие антигены. Анализ супернатанта или асцитной жидкости на наличие специфических МА проводился также прямым ИФА.

В результате из 17 клонов, продуцирующих МА к антигену SiaLe^a, было отобрано пять (D7, E5B1, 4E10, CC1 и 5H9), а из шести клонов к SiaLe^x – три (4G5, A3 и B11), в первом приближении узнающих лишь заданные при иммунизации структуры. Единственным гибридным клоном, который продуцировал МА класса IgG3, был 4G5, все остальные МА оказались класса IgM.

Для определения тонкой углеводной специфичности полученных МА применяли прямой и ингибиторный ИФА, в котором использовали широкий набор синтетических олигосахаридов, их конъюгатов с полиакриламидом, а также природный олигосахарид LSTa (см. таблицу).

МА D7, E5B1 и 4E10, полученные при иммунизации антигеном SiaLe^a, в прямом ИФА лучше всего связывались именно с этим тетрасахаридом, давая в большей или меньшей степени перекрестные реакции лишь с тетрасахаридом SiaLe^x, который структурно отличается от SiaLe^a положением связи в коровом дисахариде (рис. 1). Антитело CC1 (IgM) фактически одинаково узнавало оба тетрасахарида (рис. 1); МА-5H9 (IgM) при явном предпочтении SiaLe^a давало перекрестные реакции с несиалированной формой заданного антигена – трисахаридом Le^a, а также трисахаридом Н (тип 1), имеющим коровую структуру Galβ1-3GlcNAc (рис. 1). Следует отметить, что конъюгаты с 10–15% привязкой SiaLe^a оказались оптимальными для прямого ИФА, в то время как большая (20%) или меньшая (5–15%) плотность гаптена на РАА приводила к уменьшению величины оптического поглощения в прямом ИФА.

Прямой ИФА антител, полученных к антигену SiaLe^x, показал, что только одно из них обладает абсолютной специфичностью к заданному антигену – 4G5 (IgG3), а два других показали перекрестные реакции практически со всеми антигенами семейства Льюис с цепями типа 1 и 2 (рис. 1). Эти антитела так же, как и анти-SiaLe^a, предпочитали в прямом связывании конъюгат с 10–15% плотностью гаптена на полиакриламиде.

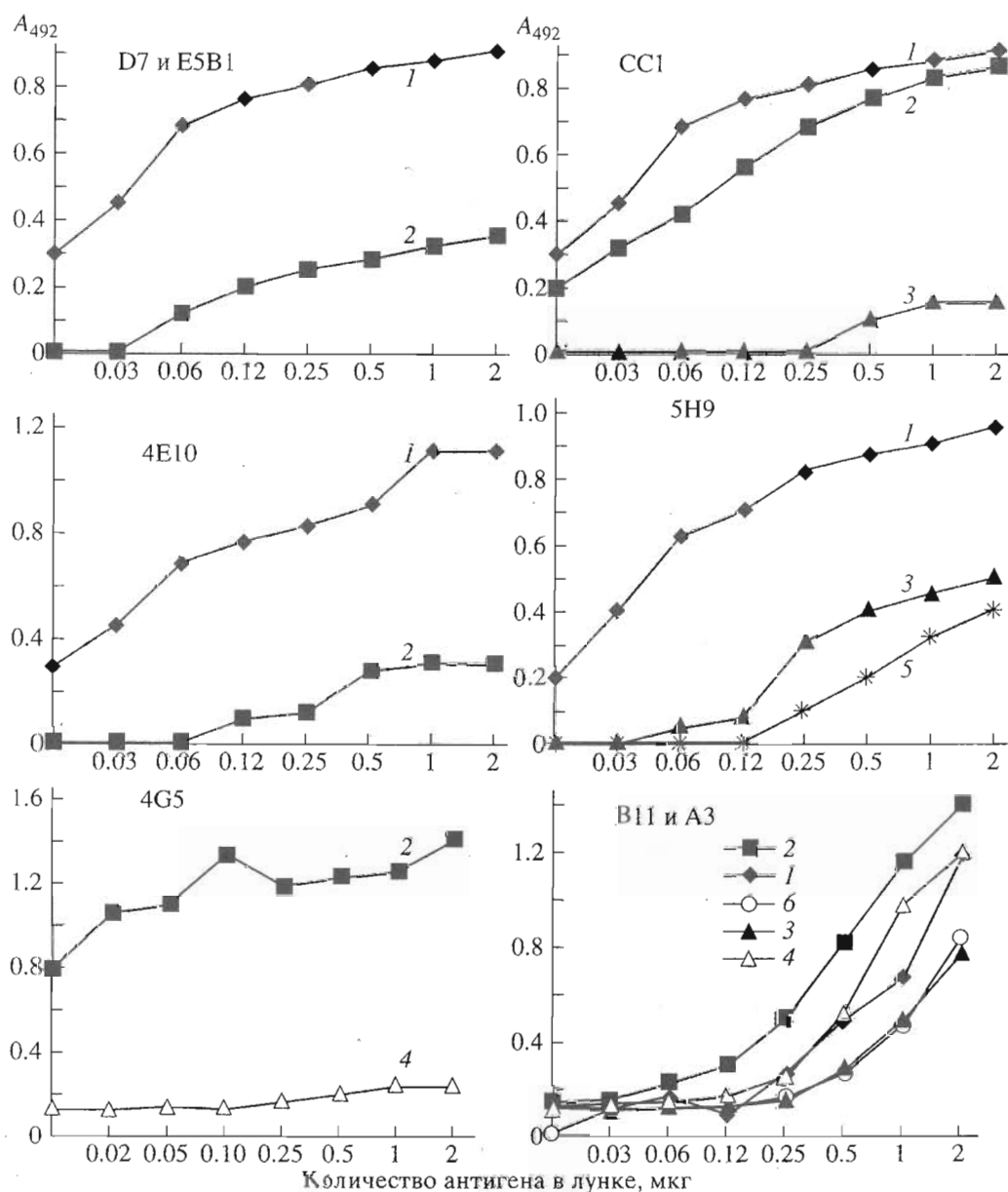


Рис. 1. Прямое связывание моноклональных антител D7, E5B1, CC1, 4E10 и 5H9, полученных к $SiaLe^a$, а также моноклональных антител 4G5, A3 и B11 к $SiaLe^x$ с антигенами: 1 – $SiaLe^a$ -PAA (20%), 2 – $SiaLe^x$ -PAA (10%), 3 – Le^a -PAA (10%), 4 – Neu5Ac-PAA (10%), 5 – H (тип 1)-PAA (10%), 6 – Le^x -PAA (10%).

Ингибиторный вариант ИФА дал возможность количественно охарактеризовать связывание МА не только с гликоконъюгатами, но и с гаптенами. Так, антитело D7 лучше связывалось с антигеном $SiaLe^a$ в конъюгированной форме, чем с гаптенем, слабо взаимодействовало с $SiaLe^x$ -PAA и практически не реагировало с мономерной формой – $SiaLe^x$ (рис. 2). Аналогично вело себя антитело E5B1 (рис. 2), но концентрация 50% ингибирования конъюгатом $SiaLe^a$ -PAA для этого антитела была на порядок выше, чем в случае МА D7 (таблица). Следует отметить, что

взаимодействие МА E5B1 с пентасахаридом LSTa, дефукозилированной формой CA 19.9, не наблюдалось вообще в отличие от антитела D7, для которого высокие концентрации LSTa вызывали значительное ингибирование связывания.

Связывание МА 4E10 ингибировалось только тетрасахаридом $SiaLe^a$ как в конъюгированной, так и в мономерной формах (рис. 2), с LSTa реакции практически не было. МА CC1 узнавало антигены $SiaLe^a$ и $SiaLe^x$ как в свободной, так и в связанной формах (рис. 2), концентрация 50% ингибирования для заданного антигена была всего

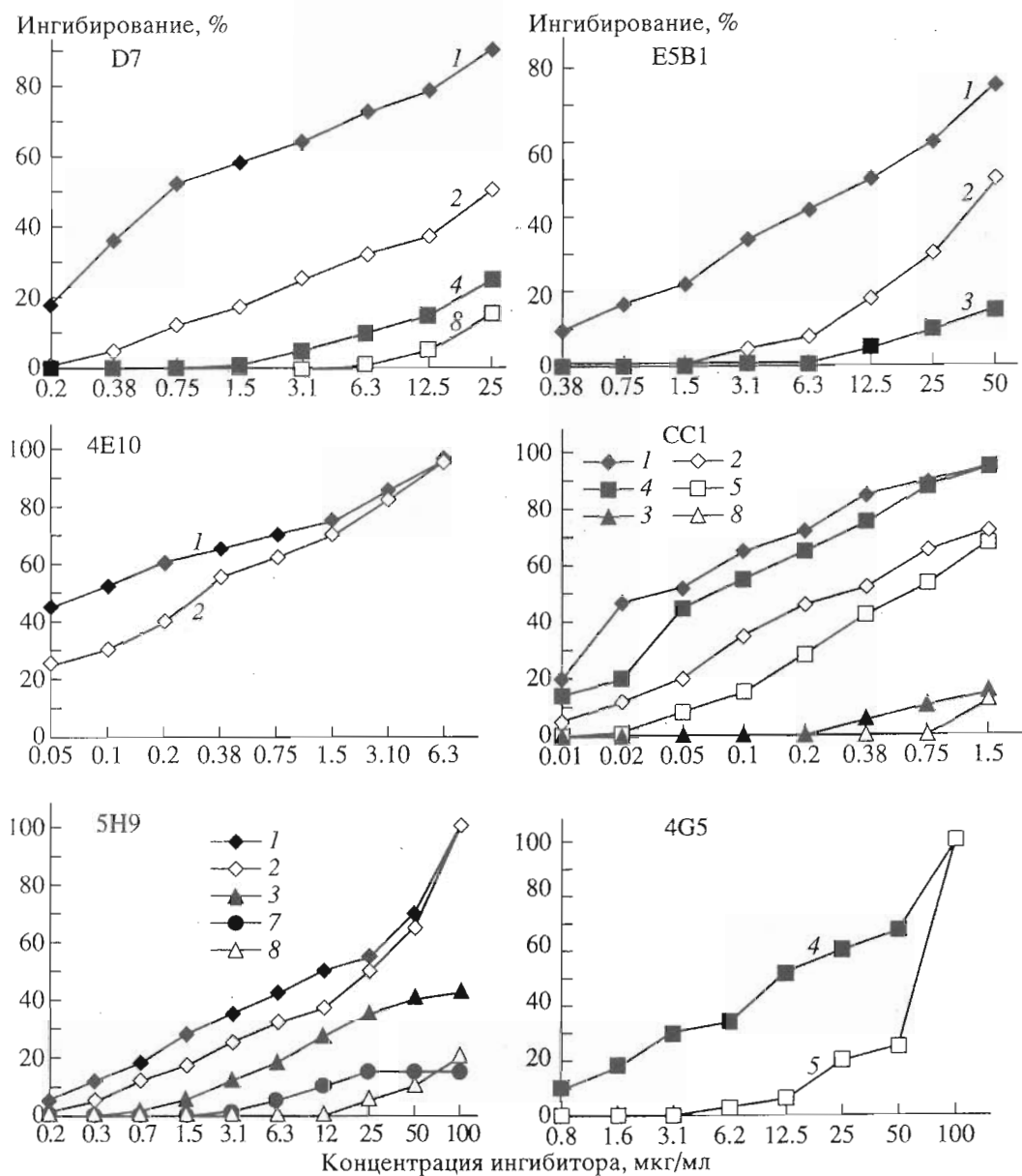


Рис. 2. Ингибирование связывания моноклональных антител D7, E5B1, CC1, 4E10 и 5H9 с SiaLe^a -PAA, а также МА 4G5 с SiaLe^x -PAA следующими антигенами: 1 – SiaLe^a -PAA (20%), 2 – SiaLe^a , 3 – Le^a -PAA (10%), 4 – SiaLe^x -PAA (30%), 5 – SiaLe^x , 6 – Le^x -PAA (10%), 7 – Н(тип 1)-PAA (10%), 8 – LSTa.

вдвое ниже, чем для SiaLe^x (таблица). Из всех представленных в таблице антител МА CC1 отличалось тем, что лучше других антител узнавало LSTa, а также в некоторой степени реагировало с Le^a -PAA и Neu5Ac -PAA. МА 5H9 давало перекрестные реакции с трисахаридами Le^a и Н (тип 1), а также с LSTa (рис. 2, таблица), среди пяти анти- SiaLe^a -антител его связывание ингибировалось максимальной концентрацией SiaLe^a -PAA.

Из трех МА, полученных при иммунизации SiaLe^x -PAA-PE, только для одного 4G5 ингибиторный ИФА показал достоверное взаимодей-

ствие с заданным антигеном; единственной структурой, которую узнавало это МА, был SiaLe^x (рис. 2 и таблица).

Таким образом, среди представленных в данной работе пяти МА к SiaLe^a и трех МА к SiaLe^x только два антитела (4E10 и 4G5) оказались высокоспецифичными к заданным при иммунизации антигенам, т.е. не взаимодействовали ни с близкими по структуре и конформации олигосахаридами, ни с три- и дисахаридными фрагментами. В литературе описаны два МА к тетрасахаридам SiaLe аналогичной эпитопной специфичности –

Ингибирование связывания моноклональных антител олигосахаридами и их полиакриламидными конъюгатами

Олигосахариды	Структура	Форма*	Концентрация 50% ингибирования (мкг/мл) связывания МА с заданными при иммунизации антигенами					
			D7	E5B1	4E10	CC1	5H9	4G5
SiaLe ^a	Galβ1-3GlcNAcβ- ↑2.3 ↑1.4 Neu5Acα Fucα	-O-sp ¹ -PAA (10%)	6	250	0.7			–
		-O-sp ¹ -PAA (20%)	12	120	1.5	0.3	120	
		-O-sp ¹ -PAA (30%)	25	250	1.5			
		-O-sp ²	250	500	2.5	2.5	250	–
Le ^a	Galβ1-3GlcNAcβ- ↑1.4 Fucα	-O-sp ¹ -PAA (10%)	–	–	–	250	500	–
		-O-sp ²	–	–	–		1000	–
3'-HSO ₃ Le ^a	Galβ1-3GlcNAcβ- ↑3 ↑1.4 HSO ₃ Fucα	-O-sp ²	–	–	–		–	–
Le ^b	Galβ1-3GlcNAcβ- ↑1.2 ↑1.4 Fucα Fucα	-O-sp ¹ -PAA (10%)	–	–	–	–	–	–
SiaLe ^x	Galβ1-4GlcNAcβ- ↑2.3 ↑1.3 Neu5Acα Fucα	-O-sp ¹ -PAA (10%)	25	50	–			12.5
		-O-sp ¹ -PAA (20%)	25	125	–	0.75		
		-O-sp ²	–	–	–	100		125
Le ^x	Galβ1-4GlcNAcβ- ↑1.3 Fucα	-O-sp ¹ -PAA (10%)	–	–	–	–		–
		-O-sp ²	–	–	–			–
3'-HSO ₃ Le ^x	Galβ1-4GlcNAcβ- ↑3 ↑1.3 HSO ₃ Fucα	-O-sp ²	–	–	–			–
Le ^y	Galβ1-4GlcNAcβ- ↑1.2 ↑1.3 Fucα Fucα	-O-sp ¹ -PAA (15%)	–	–	–	–		–
H (тип 1)	Galβ1-3GlcNAcβ- ↑1.2 Fucα	-O-sp ¹ -PAA (10%)	–	–	–		1000 – (10)**	–
H (тип 2)	Galβ1-4GlcNAcβ- ↑1.2 Fucα	-O-sp ²	–	–	–			–
LSTa	Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc-OH		1000 – (35)**	–	1000 – (10)**	500 – (40)**	1000 – (25)**	
Le ^c	Galβ1-3GlcNAcβ-	-O-sp ¹ -PAA (10%)	–	–	–			–
		-O-sp ²		–	–			–
LacNAc	Galβ1-4GlcNAcβ-	-O-sp ²	–	–	–			–
	Neu5Acα-	-O-sp ¹ -PAA (10%)	–	–	–	1000 – (30)**		–

* В скобках приведена плотность гаптена на PAA-матрице.

Слейсер для конъюгированных форм: – sp¹ = –CH₂CH₂CH₂–; для мономерных форм: – sp² = –CH₂CH₂CH₂NHCOCF₃ или –CH₂CH₂CH₂NH₂.

** В скобках приведена степень ингибирования связывания МА (в %) при указанной концентрации.

SCLEA-1 [13] и 2D3 [28], причем первое получено при иммунизации клетками аденокарциномы кишечника, несущими SiaLe^a, а второе – к гликолипиду SiaLe^x-Lact-Cer. К антигену SiaLe^x также описано только два МА, CSLEX-1 [13] и АМ-3 [27], с абсолютной специфичностью к тетрасахариду. Первое получено при иммунизации клетками аденокарциномы желудка, а второе – к муцину, выделенному из опухоли кишечника.

Два других, полученных в этой работе МА к SiaLe^a (D7 и E5B1), давали небольшую перекрестную реакцию с позиционным изомером заданного антигена, тетрасахаридом SiaLe^x, а одно МА (CC1) практически одинаково узнавало SiaLe^a и SiaLe^x, реагируя также и с дефукозилированной формой маркера СА 19.9 – пентасахаридом LSTa, хотя и значительно слабее, чем с тетрасахаридами SiaLe. Известно несколько подобных антител, полученных при иммунизации раковыми клетками и не различающих тетрасахариды SiaLe^a и SiaLe^x, – Co12.11 [14], HECA-452 [6], ST-4-39 [10]. Антитела подобного рода реагируют с раковыми клетками различной этиологии, в некоторых случаях давая перекрестные реакции с клетками нормальных тканей.

Пятое МА к SiaLe^a (5H9) давало перекрестные реакции с трисахаридом Le^a, т.е. с десилированной формой заданного при иммунизации антигена, а также с Н (тип 1) и LSTa. Подобные им по специфичности антитела Co29.11 и CC3C195 получены при иммунизации клетками карциномы кишечника [16, 38]. Серологические исследования показали, что МА такой специфичности выявляют СА 19.9 в сыворотке пациентов при карциноме кишечника и не взаимодействуют с сывороткой и тканями здоровых доноров.

Большое количество перекрестных реакций с олигосахаридными цепями типов 1 и 2 двух последних антител, А3 и В11, полученных при иммунизации SiaLe^x, а также еще нескольких антител, полученных при иммунизации SiaLe^a, но не рассматриваемых в данной работе, свидетельствуют о сложности получения специфических МА к сиаололигосахаридам. Даже использование химически индивидуальных иммуногенов приводило к относительно слабому и широкому по специфичности иммунному ответу. При аналогичной схеме иммунизации и при одинаковой конструкции синтетического иммуногена ответ у мышей [34] к Le^y значительно превосходил реакцию на антигены SiaLe, которые, по-видимому, не являются чужеродными для мышей. Вероятно, это связано с необычной презентацией антигенов SiaLe у мышей, о чем свидетельствует работа S.-I. Nakomori, которым было показано, что типичные анти-SiaLe^x-МА не выявляют этот антиген на клетках крови

мышей, хотя взаимодействие с селектинами имеет место (устное сообщение).

Проведенное изучение эпитопной специфичности полученных МА и сравнение с эпитопной специфичностью описанных в литературе диагностически значимых антител к SiaLe^a дают основание выбрать полученные МА 4E10 и 5H9 для дальнейшего исследования в качестве специфических реагентов при выявлении опухолеассоциированного антигена СА 19.9 у онкологических больных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтетические гликоконъюгаты и иммуногены. Конъюгаты SiaLe^a-РАА и SiaLe^x-РАА с разной плотностью гаптана, растворимые в воде, легко сорбирующиеся на поверхности полистироловых планшетов, получали по методу, описанному ранее [36], синтез спейсерированных тетрасахаридов описан в работе [37]. В качестве иммуногена использовали конъюгаты, в которых 15% амидных групп РАА были связаны с тетрасахаридом и столько же амидных групп – с фосфатидилэтаноломином (РЕ). SiaLe^a-РАА-РЕ или SiaLe^x-РАА-РЕ встраивали в мембрану инактивированной бактерии *Salmonella minnesota* (мутантный штамм R595, дефицитный по углеводам): 1 мг иммуногена растворяли в 0.5 мл смеси этанол-Н₂О (1 : 1) и добавляли к 4 мг бактериальной суспензии в 0.5 мл 0.15 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ), рН 7.4. Смесь инкубировали 25 мин при 50°C на магнитной мешалке, затем готовили аликвоты растворов, содержащие 20 мкг иммуногена. Хранили аликвоты при -20°C и размораживали один раз, перед инъекцией.

Иммунизацию мышей линии Balb/c проводили внутривенно пятикратно через 10–12 сут, инъекцируя SiaLe^a-РАА-РЕ или SiaLe^x-РАА-РЕ, связанные с бактерией, в ретроорбитальный синус. Для получения МА к антигену SiaLe^a в первый день вводили 100 мкл суспензии, содержащей 10 мкг иммуногена, а остальные четыре инъекции производили вдвое большей дозой иммуногена. Для получения МА к антигену SiaLe^x использовали аналогичную схему иммунизации, но количество иммуногена было удвоено по сравнению с SiaLe^a.

Гибридизация. Слияние спленоцитов иммунизированной мыши, показавшей максимальный иммунный ответ, с миеломными клетками X-63 осуществляли через 3–5 сут после последней инъекции при помощи полиэтиленгликоля PEG 4000 (Serva) по стандартной методике [38]. Отбор позитивных клонов проводили при помощи прямого ИФА, сенсibiliзируя полистироловый планшет соответствующими антигенами SiaLe^a-РАА или SiaLe^x-РАА. Клонирование гибридом проводили методом лимитирующих разведений, тестируя

культуральную жидкость на присутствие специфических антител, в конечном итоге добываясь 100% выявления антител в супернатанте каждой лунки тестируемого 96-луночного планшета с гибридными клетками.

Иммуоферментный анализ. Для проведения прямого ИФА в лунки 96-луночного полистиролового планшета (Linbro) вносили по 100 мкл раствора, содержащего SiaLe^a-РАА (15%) или SiaLe^x-РАА (15%), приготовленного серией двукратных разведений в 0.05 М Na-карбонатном буфере (рН 9.6) в концентрации 0.05–10 мкг/мл, и полностью высушивали при 37°C. Далее планшет инкубировали со 100 мкл 1% раствора желатина в течение 1 ч при 37°C и промывали 0.15 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0.05% Твин-20. Затем в лунки планшета вносили 100 мкл клеточного супернатанта или асцитной жидкости в заранее подобранном разведении и инкубировали 30 мин при 37°C. После трехкратной промывки ФСБ с 0.05% Твина проводили 40-мин инкубацию при комнатной температуре со 100 мкл конъюгата овечьих антител против иммуноглобулинов мыши, меченных пероксидазой хрена (Dakorats, Дания), в ФСБ. Планшет промывали и в лунки вносили раствор *o*-фенилендиамина (4 мг/мл) в 0.1 М цитратном буфере (рН 5), содержащем 4 мкл 30% H₂O₂. Реакцию останавливали через 15 мин добавлением в каждую лунку планшета 50 мкл раствора 50% серной кислоты. Количественно результаты ИФА измеряли на спектрофотометре Labsystem Multiskan MCC 1340 при длине волны 492 нм.

Для проведения ингибиторного ИФА после сенсibilизации планшета раствором соответствующего антигена в концентрации 5 мкг/мл, а затем желатином, как описано выше, в лунки последовательно вносили по 50 мкл раствора ингибитора, начиная от 1 мг/мл в ФСБ, и 50 мкл раствора исследуемых антител в виде супернатанта или асцита. В качестве ингибиторов были использованы олигосахариды и их конъюгаты, приведенные в таблице.

Определение подкласса антител проводили прямым ИФА с помощью коммерческих наборов Mouse monoclonal antibody isotyping reagents (Sigma) и Mouse-hybridoma subtyping kit (Boehringer-Mannheim).

Работа финансировалась грантом РФФИ 95-04-11786. Авторы благодарят сотрудников лаборатории химии углеводов Института биоорганической химии РАН Н.Э. Байрамову, Т.В. Тыртыш, Е.Ю. Корчагину, Т.В. Овчинникову за синтез олигосахаридных структур и их конъюгатов, а также В.Е. Пискарева (Институт пищевых веществ, РАН) за любезно предоставленный LSTa.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Shashkov A.S., Kononov L.O., Menshov V.M., Tuzikov A.V., Bovin N.V. // *J. Carbohydr. Chem.* 1996. In press.
2. Kanai T., Hirohashi S., Upton M., Ino Y., Shimosato Y. // *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*. 1987. V. 78. P. 968–976.
3. Hirohashi S., Shimosato Y., Ino Y., Tome Y. // *Gann*. 1984. V. 75. P. 540–547.
4. Sell S. // *Critical Revs Oncogenesis*. 1993. V. 4. P. 419–433.
5. Narita T., Funahashi H., Satoh Y., Watanabe T., Sakamoto J., Takagi H. // *Cancer*. 1993. V. 71. P. 3044–3053.
6. Hakomori S. // *Ann. Rev. Immunol.* 1984. V. 2. P. 103–126.
7. Berg H., Robinson M., Mansson O., Butcher E., Magnani J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 14869–14872.
8. Munro J., Lo S., Corless C., Robertson M., Lee N., Barnhill R., Weinberg D., Bevilacqua M. // *Am. J. Pathol.* 1992. V. 141. P. 1397–1408.
9. Yago K., Zenita K., Ginya H., Sawada M., Ohmori K., Okuma M., Kannagi R., Lowe J. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 5559–5565.
10. Pfeiffer R., Dimitriadis K., Balzer K., Aulbert E., Hoffman B., Schmidt C. // *Tumor Diagnostik Therapic*. 1984. V. 5. P. 196–200.
11. Watanabe M., Hirohashi S., Shimosato Y., Ino Y., Yamada T., Teshima S., Sekine T., Abe O. // *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*. 1987. V. 76. P. 968–976.
12. Ohta H., Sawabu N., Takemori Y., Kidani H., Wakabayashi T., Satamura Y., Watanabe H., Motoo Y., Okai T., Takashi H. // *Int. J. Pancreatol.* 1994. V. 15. P. 35–41.
13. Venegas M., Liu L., Lovell L., Davis L., Anderson B., Wilbanks T., Hass M., Manderino G., Rittenhouse H. // *Glycoconjugate J.* 1989. V. 6. P. 511–524.
14. Chia D., Terasaki P., Suyama N., Galton J., Hirota M., Katz D. // *Cancer Res.* 1985. V. 45. P. 435–437.
15. Magnani J., Steplewski Z., Koprowski H., Ginsbyrg V. // *Cancer Res.* 1983. V. 43. P. 5489–5492.
16. Brockhaus M., Wysocka M., Magnani J., Steplewski Z., Koprowski H., Ginsburg V. // *Vox Sang.* 1985. V. 48. P. 34–38.
17. Herlyn M., Blaszczyk M., Bennicelli J., Sears H., Ernst C., Ross A., Koprowski H. // *J. Clin. Immun.* 1982. V. 2. P. 135–140.
18. Shumono R., Mori M., Akazawa K., Adachi Y., Sgimachi K. // *Am. J. Gastroenterol.* 1994. V. 89. P. 101–105.
19. Tempero M., Uchida E., Takasaki H., Burnett D., Steplewski Z., Pour P. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 5501–5503.
20. Koprowski H., Steplewski Z., Mitchell K., Herlyn M., Herlyn D., Fuhrer P. // *Somatic Cell. Genet.* 1979. V. 5. P. 957–972.
21. Bechtel B., Wand A., Wroblewski K., Koprowski H., Thuring J. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 2028–2037.
22. Nilsson O., Mansson J., Lindholm L., Holmgren J., Svennerholm L. // *FEBS Lett.* 1985. V. 182. P. 398–402.
23. Hirohashi S., Watanabe M., Shimosato Y., Sekine T. // *Gann*. 1984. V. 75. P. 485–488.
24. Fukuta M., Magnani J., Gaur P., Ginsburg V. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1987. V. 225. P. 214–216.

25. Stei berg W., Gelfand R., Anderson K., Glenn J., Kurtzman S., Sindelar W., Toskes P. // *Gastroenterology*. 1986. V. 90. P. 343–349.
26. Dohi T., Nemoto T., Ohta S., Shitara K., Hanai N., Nudelman E., Hakomori S.-I., Oshima M. // *Anticancer Res.* 1993. V. 13. P. 1277–1282.
27. Fukushi K., Nudelman E., Levery S.B., Hakomori S., Rauvala H. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 10511–10517.
28. Hanski C., Drechsler K., Hanisch F., Sheehan J., Manske M., Ogorek D., Klussman E., Hanski M., Blank M., Xing P., McKenzie F., Devine P., Riecken E. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 4082–4088.
29. Ohmori K., Takada A., Ohawaki I., Takahashi N., Furukawa Y., Maeda M., Kiso M., Hasegawa A., Kannagi M., Kannagi R. // *Blood*. 1993. V. 82. P. 2797–2805.
30. Jagirdar J., Thung S.N., Shah K.D., Nudelman E., Singh A., Paranetto F. // *Arch. Pathol. Labor. Med.* 1992. V. 116. P. 643–648.
31. Nakagoe T., Fukushima K., Hirota M., Kusano H., Ayabe H., Tomita M., Kamihira S. // *Cancer*. 1993. V. 72. P. 2323–2330.
32. Nakamori S., Kameyama M., Imaoka S., Furukawa H., Ishikawa O., Sasaki Y., Kabuto T., Iwanaga T., Matsushita Y., Irimura T. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 3632–3637.
33. Takada A., Ohmori K., Yoneda T., Tsuyuoka K., Hasegawa A., Kiso M., Kannagi R. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. P. 354–361.
34. Ito K., Handa K., Hakomori S. // *Glycoconjugate J.* 1994. V. 11. P. 232–237.
35. Vlasova E.V., Byramova N.E., Tuzikov A.B., Zhigis L.S., Rapoport E.M., Khaidukov S.V., Bovin N.V. // *Hybridoma*. 1994. V. 4. P. 283–289.
36. Bovin N., Korchagina E., Zemlyanukhina T., Byramova N., Galanina O., Zemlyakov A., Ivanov A., Zubov V., Mochalova L. // *Glycoconjugate J.* 1993. V. 10. P. 142–151.
37. Нифантьев Н.Э., Цветков Ю.Е., Шаилов А.С., Тузиков А.Б., Масленников И.В., Попова И.С., Бовин Н.В. // *Биоорг. химия*. 1994. Т. 20. С. 551–555.
38. Kohler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 485–497.

Receptors of Selectins. 5¹. Monoclonal Antibodies to Synthetic Antigens SiaLe^a and SiaLe^x

**E. V. Vlasova*, M. M. Vorozhaikina*, L. S. Khral'tsova*, A. B. Tuzikov*,
I. S. Popova*, Yu. E. Tsvetkov**, N. E. Nifant'ev**, and N. V. Bovin*²**

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

** *Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117334 Russia*

Abstract—Five IgM class monoclonal antibodies (MAb) to the SiaLe^a tetrasaccharide, which is known as a serologic tumor marker CA 19.9, and three MAbs (one of IgG3 and two of IgM class) to the SiaLe^x tetrasaccharide (differentiation antigen CD15s) were obtained against totally synthetic immunogens. The epitope specificity of the antibodies was determined using a wide range of oligosaccharides and their polyacrylamide conjugates. MAb 4E10 against SiaLe^a and MAb 4G5 to SiaLe^x were highly specific to the antigen predefined by immunization: they did not cross-react either with structurally and conformationally related oligosaccharides or with their disaccharide fragments. Two MAbs to SiaLe^a (D7 and E5B1) showed a weak binding to SiaLe^x. MAb CC1 recognized SiaLe^a and SiaLe^x almost equally, and MAb 5H9 to SiaLe^a cross-reacted with the non-sialylated form, the Le^a trisaccharide. Two MAbs against SiaLe^x A3 and B11 bound to all carbohydrate structures containing the core disaccharide Galβ1-3(4)GlcNAc.

Key words: monoclonal antibodies, synthetic immunogens, SiaLe^a, SiaLe^x, carbohydrate tumor markers, CA 19.9, CD15s.

¹ Part 4, see [1].

² To whom correspondence should be addressed.