



УДК 57. 083. 3

© 1993 Т. Ю. Мареева, О. В. Котова,  
Е. А. Макаров, Т. М. Андропова, В. А. Несмеянов

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИЛ-( $\beta$ 1-4)-N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ- АЛАНИЛ-D-ИЗОГЛУТАМИНУ

Институт биоорганической химии  
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

В результате гибридизации спленоцитов мыши, иммунизированной конъюгатом N-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин (GMDP) с метилированным бычьим сывороточным альбумином, и клеток миеломной линии SP 2/0 получена гибридная линия E6/1.2, продуцирующая моноклональные антитела (МА) к GMDP. МА E6/1.2 относятся к подклассу IgG1 и имеют константу сродства к GMDP, равную  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ . По данным конкурентного иммуноферментного анализа, наибольший вклад во взаимодействие этих антител с GMDP вносят углеводный фрагмент GlcNAc-( $\beta$ 1-4)-MurNAc и первая аминокислота — аланин.

Мурамоилдипептид (MDP), минимальная структура клеточной стенки бактерий, способная заменять микобактериальный компонент в полном адъюванте Фрейнда [1], обладает иммуномодулирующими свойствами и может влиять на центральную нервную систему [2]. MDP и родственные ему по структуре гликопептиды, в состав которых входит мурамовая кислота, называют мурамоилпептидами (МП).

Молекулярные основы действия МП до сих пор неизвестны. Многие исследователи склоняются к мысли о включении в процессы с их участием рецепторного механизма [3—6], однако полученные к настоящему времени данные весьма противоречивы.

В последнее десятилетие разработана оригинальная методика исследования рецепторов биологически активных лигандов с помощью антиидиотипических антител. В ее основе лежит предположение Сежа и Петерсона [7] о том, что антиидиотипические антитела к биологически активным лигандам могут имитировать их пространственную структуру и связываться с соответствующим рецептором. Эта идея подтверждена в опытах с антиидиотипическими антителами к

Сокращения: GMDP — N-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин; GMDP-лизин — N-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамил-лизин; L-L-аналог GMDP — N-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-N-ацетилмурамоил-аланил-L-изоглутамин; MDP — N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин; МП — мурамоилпептиды; МА — моноклональные антитела; MeBSA — метилированный бычий сывороточный альбумин; GMDP-MeBSA — конъюгат GMDP с MeBSA; GMDP-AL — конъюгат GMDP с poly[(D, L-Ala)<sub>n</sub> Lys]; Ac-AL — ацетилированный poly[(D, L-Ala)<sub>n</sub> Lys]; EDAC — хлоридат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; PBS — 0,01 M фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,15 M NaCl; PBST — PBS, содержащий 0,1% Твина 20; iGln — изоглутамин.

инсулину [8] и в дальнейшем нашла практическое применение для исследования рецепторов ряда лигандов (см. обзоры [9,10]).

С целью использования данного подхода для исследования рецептора МП нами было предпринято получение моноклональных антител к N-ацетилглюкозаминил-( $\beta$ 1-4)-N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамину (GMDP) — биологически активному аналогу MDP [11]. Данные антитела в дальнейшем предполагается использовать для получения антиидиотипических антител к GMDP.

Было показано, что MDP, как и любой гаптен, сам по себе не является иммуногенным [12]. Однако конъюгаты, полученные путем ковалентного присоединения MDP к белкам-носителям, при введении животным инициировали иммунный ответ на MDP. Иммунизируя кроликов и мышей Balb/c конъюгатом MDP с метилированным бычьим сывороточным альбумином (MeBSA), группе исследователей удалось получить поликлональные [13], а затем и моноклональные антитела [14] к MDP. Так как MDP и GMDP близки по структуре, для получения моноклональных антител (МА) к GMDP мы применили аналогичный подход.

Оптимальный тип связи между GMDP и носителем — пептидная связь между  $\gamma$ -карбоксильной группой остатка D-изоглутамина GMDP и первичными аминогруппами носителя, поскольку именно этот тип связи характерен для клеточных стенок бактерий, где D-изоглутамин чаще всего связан через  $\gamma$ -карбоксильную группу с  $\alpha$ -аминогруппой D-мезо-диаминопимелиновой кислоты или лизинном. При таком типе связи не вводится никаких дополнительных антигенных спейсерных групп, способных влиять на специфичность иммунного ответа.

Конъюгаты GMDP с MeBSA (GMDP-MeBSA) и poly[(D, L-Ala)<sub>n</sub>Lys] (GMDP-AL) были синтезированы в лаборатории химии пептидов ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН по методике [15]. Конъюгат GMDP с овальбумином (GMDP-OVA) получили с помощью водорастворимого карбодимиды (EDAC) по методике [13].

Для иммунизации мышей конъюгатом GMDP-MeBSA была выбрана длительная схема иммунизации (см. «Экспериментальную часть»). Через неделю после четвертой иммунизации сыворотки мышей проверяли в твердофазном ИФА на наличие антител к GMDP. В качестве антигенов, сорбированных в лунках микропланшетов, использовали GMDP, конъюгат GMDP-AL или ацетилованное производное poly[(D, L-Ala)<sub>n</sub>Lys] (Ac-AL) при концентрации соответственно 50, 20 и 20 мкг/мл в PBS. Конъюгат GMDP-AL брали вместо GMDP-MeBSA с тем, чтобы исключить из рассмотрения антитела к носителю — MeBSA, а Ac-AL служил контролем неспецифической сорбции антител на poly[(D, L-Ala)<sub>n</sub>Lys]. В качестве контрольной использовалась сыворотка этих же мышей, взятая до начала иммунизации.

Из рис. 1 видно, что, в то время как иммунная сыворотка давала хорошо детектируемое связывание с конъюгатом GMDP-AL вплоть до разведения 1:25 000, никакой активности этой сыворотки по отношению к Ac-AL обнаружено не было. Контрольная сыворотка не давала заметного фона при тестируемых разведениях ни с GMDP-AL, ни с Ac-AL. Эти результаты свидетельствовали о наличии антител к GMDP в сыворотках иммунизированных мышей, т. е. конъюгат GMDP с метилированным бычьим сывороточным альбумином индуцировал иммунный ответ к GMDP.

Связывание иммунной сыворотки при тех же разведениях с самим GMDP, сорбированным на микропланшете, было заметно слабее, что, вероятно, можно объяснить стерическими затруднениями, плохой адсорбцией GMDP на пластике или значительной десорбцией антигена при промывках. Для обеспечения высокой чувствительности анализа все дальнейшие опыты по связыванию антител проводились с конъюгатами GMDP-AL и GMDP-OVA.

Для детальной характеристики специфичности гуморального ответа на GMDP исследовалось ингибирование GMDP или его производными связывания антител

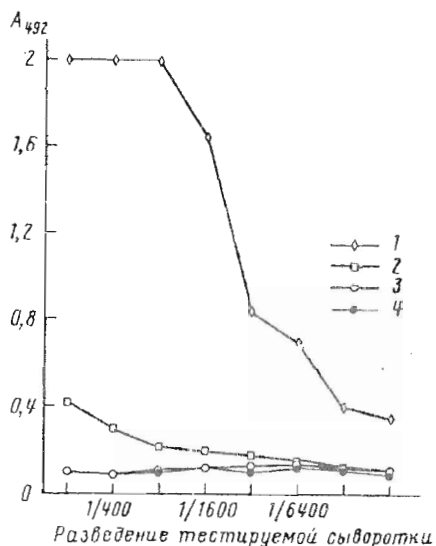


Рис. 1

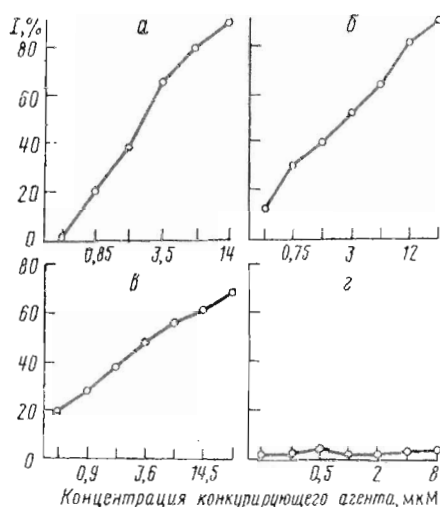


Рис. 2

Рис. 1. Тестирование сыворотки иммунной мыши с помощью твердофазного ИФА. В качестве антигенов нанесены GMDP-AL (1), GMDP (2), Ac-AL (3). Контроль (4) — сыворотка неиммунной мыши и GMDP-AL.

Рис. 2. Конкурентное ингибирование взаимодействия сыворотки иммунной мыши с конъюгатом GMDP-AL при добавлении в качестве конкурирующего агента GMDP (а), GMDP-лизина (б), *L-L*-аналога GMDP (в) или MDP (г). Ось абсцисс здесь и на рис. 3 приведена в логарифмической шкале ( $\log_2$  С).

с GMDP-AL в конкурентном твердофазном ИФА. Степень ингибирования ( $I$ , %) определяли по формуле

$$I = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot 100,$$

где  $A_0$  и  $A_i$  — оптическое поглощение образца без ингибитора и с ингибитором при 492 нм.

При добавлении в качестве конкурирующего агента GMDP, GMDP-лизина или аналога GMDP, содержащего остаток *L*-iGln вместо *D*-iGln (*L-L*-аналог GMDP), в диапазоне концентраций от 30 до 0,4 мкМ наблюдалось линейное дозозависимое ингибирование связывания иммунной мышиной сыворотки с конъюгатом GMDP-AL (рис. 2а-в). В то же время не наблюдалось никакого ингибирования при добавлении в качестве конкурирующих агентов MDP (вплоть до концентрации 80 мкМ) (рис. 2г), дисахарида GlcNAc $\beta$ 1-4MurNAc (184 мкМ) и *N*-ацетилглюкозамина (181 мкМ). Таким образом, полученные результаты подтвердили специфичность иммунного ответа к GMDP.

Для гибридизации, проводимой по обычной методике [16], использовали спленоциты мыши, сыворотка которой имела самый высокий титр к GMDP в твердофазном ИФА. Отбор положительных клонов проводили на 10–14-е сут методом твердофазного ИФА. В качестве антигена использовали конъюгат GMDP-OVA, сорбируя его в лунках микропланшета при концентрации 20 мкг/мл в PBS в течение 1 ч при 37°С. Отрицательным контролем служили лунки с адсорбированным при той же концентрации овальбумином.

Число положительных клонов оказалось невелико (7). Некоторые из них были нестабильными и утратили активность после замораживания в жидком азоте. Другие, как выяснилось при дальнейших исследованиях, продуцировали антитела на смешанную антигенную детерминанту, образованную как моле-

кулой GMDP, так и молекулой белка-носителя. После клонирования методом лимитирующих разведений удалось обнаружить стабильный клон, продуцирующий моноклональные антитела к GMDP. Первичный клон повторно клонировали и отобрали наиболее активный субклон Е6/1.2.

С целью наработки препаративных количеств МА гибридные клетки вводили внутривенно мышам линий Balb/c ( $2 \cdot 10^6$  клеток на мышь), предварительно (за 14 сут) получившим инъекцию 0,5 мл pristana. Рост опухоли в асцитной форме наблюдался у 80% животных. В ряде случаев гибридные клетки выращивали *in vitro*. Концентрация моноклональных антител в асцитной жидкости составила 4—5 мг/мл, а в культуральной жидкости — до 100 мкг/мл. Продукция иммуноглобулинов на указанном уровне сохранялась в течение 20 пассажей за 2 месяца непрерывного культивирования и не нарушалась при размораживании гибридного клона после консервации его в жидком азоте.

МА Е6/1.2 выделяли из клеточного супернатанта и асцитной жидкости с помощью аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным GMDP-лизином.

Полученные препараты МА Е6/1.2 проверяли на активность в твердофазном ИФА, чистоту оценивали с помощью SDS-электрофореза в 10% полиакриламидном геле [17]. При использовании описанного способа очистки антитела полностью сохраняли свою активность, а чистота препаратов составляла 90—95%.

С помощью твердофазного ИФА с использованием коммерческих антисывороток против субклассов иммуноглобулинов мыши было показано, что моноклональные антитела Е6/1.2 принадлежат к классу G, подклассу 1 и несут легкую цепь  $\kappa$ -типа. Константа связывания МА Е6/1.2 с конъюгатом GMDP-OVA, определенная по методу Беатти с соавт. [18], оказалась равной  $2 \cdot 10^9$  M<sup>-1</sup>, т. е. эти антитела были высокоаффинными.

Специфичность МА Е6/1.2 исследовали с помощью конкурентного анализа, как описано выше, и по графикам зависимости степени ингибирования реакции от разведения конкурирующего агента рассчитывали концентрацию каждого производного, дающую 50% ингибирования в условиях проведения опыта ( $CI_{50}$ ) (рис. 3). Оказалось, что для GMDP, GMDP-лизина и *L,L*-аналога GMDP значения  $CI_{50}$  очень близки (7,3, 7,6 и 8,6 мкМ соответственно), в то время как для дисахарида GlcNAc-MurNAc  $CI_{50}$  примерно в 100 раз выше (768 мкМ), а для MDP, дипептида Ala-D-iGln, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты не наблюдалось никакого специфического дозозависимого конкурентного ингибирования вплоть до концентрации 1000 мкМ.

На основании полученных результатов можно заключить, что, поскольку не наблюдается ингибирования связывания антител при добавлении в качестве конкурирующего агента MDP, для распознавания антигена антителами Е6/1.2 необходимо наличие остатка N-ацетилглюкозамина, причем существенно наличие именно дисахаридного фрагмента GlcNAc-MurNAc, так как ни N-ацетилглюкозамин, ни N-ацетилмурамовая кислота по отдельности не оказывают заметного конкурентного действия. При отсутствии пептидной части в молекуле антигена сродство антитела к нему падало примерно в 100 раз. Таким образом, аминокислотные остатки вносят значительный вклад в связывание с антителами. В то же время замена остатка D-iGln на L-изомер практически не изменяет сродство МА Е6/1.2 к антигену, т. е. относительная конфигурация остатка iGln не столь уж важна. Все это свидетельствует о том, что при иммунном ответе на конъюгат GMDP-MeBSA GMDP специфично распознается как некая целостная антигенная детерминанта, определенным образом организованная в пространстве. Как можно было ожидать, добавление C-концевого остатка лизина не влияло на узнавание антигена антителами.

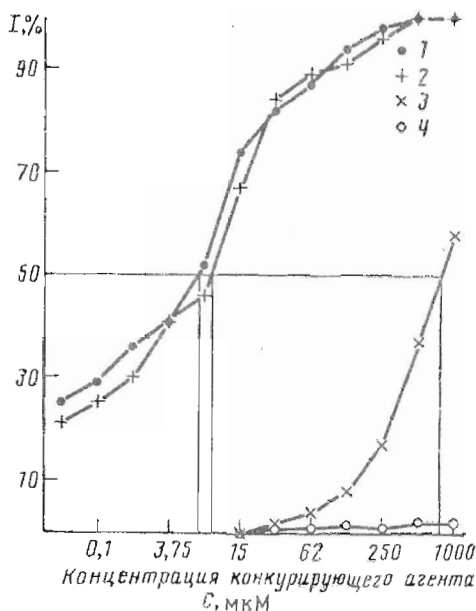


Рис 3. Конкурентное ингибирование взаимодействия МА Е6/1.2 с конъюгатом GMDP-AL в присутствии GMDP (1), L-L-аналога GMDP (2), дисахарида GlcNAc-MurNAc (3) или MDP (4)

Таким образом, МА Е6/1.2 были высокоаффинными и специфично взаимодействовали с GMDP, что позволило использовать их для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антиидиотипические антитела, имитирующие пространственное строение GMDP.

### Экспериментальная часть

В работе использованы метилированный бычий сывороточный альбумин, пристан и орто-фенилендиамин (Sigma, США), овальбумин (Calbiochem, США), хлоргидрат 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, 1-гидроксибензотриазол и 2-меркаптоэтанол (Fluka, Швейцария), трис(гидроксиметил)аминометан, диметилформамид и диметилсульфоксид (Merck, ФРГ), полный адъювант Фрейнда, среды RPMI-1640 и НАТ, эмбриональная телячья сыворотка, L-глутамин (Gibco, Шотландия; Flow, Великобритания), полиэтиленгликоль 6000 (Serva, ФРГ), конъюгат кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена (Dakopatts, Дания), моноспецифические антисыворотки кролика против субклассов иммуноглобулинов мыши (DRG, США), желатин (Serva, ФРГ), Твин 20 (Ferak, Западный Берлин), СН-сефароза 4В (Pharmacia, Швеция).

GMDP, GMDP-лизин, L, L-аналог GMDP, MDP, дисахарид GlcNAc-MurNAc и дипептид Ala-D-iGln были синтезированы в лаборатории химии пептидов ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН [11]. Конъюгат GMDP-AL был синтезирован там же по методике [15]. Конъюгат GMDP-MeBSA был любезно предоставлен В. В. Юровским.

Конъюгат GMDP-OVA был получен по методике [13] с некоторыми модификациями: 70 мг (0,1 мкмоль) GMDP активировали добавлением 320 мг (2 ммоль) EDAC и 13,6 мг (0,1 ммоль) 1-гидроксибензотриазола, растворенных в 3 мл диметилформамида, в течение 1 ч. Активированный GMDP смешивали с 80 мг (2 мкмоль) овальбумина, растворенного в 1,3 мл воды и 0,55 мл 0,5 М бикарбоната натрия. Реакционную смесь перемешивали 1 ч при 20° С и в течение ночи при 4° С, затем диализовали против двух смен PBS, разделяли на аликваты и хранили в 50% глицерине при -20° С.

*Иммунизация.* Самок мышей Balb/c в возрасте 10 недель четырехкратно иммунизировали конъюгатом GMDP-МеBSA (внутрибрюшинно, по 100 мкг конъюгата на мыш) по следующей схеме: три иммунизации в полном адьюванте Фрейнда с интервалом в 1 месяц и последняя — 3 месяца спустя в физиологическом растворе.

*Твердофазный ИФА.* Антиген в объеме 100 мкл сорбировали 1 ч при 37° С в лунках 96-луночного микропланшета. Несвязавшиеся сайты блокировали добавлением в каждую лунку 200 мкл 0,1% раствора желатина, через 1 ч планшет трижды отмывали PBST и трижды PBS. В лунки добавляли по 100 мкл тестируемой сыворотки в серийных двукратных разведениях или гибридного супернатанта, разведенных в PBS, и инкубировали 1 ч при 37° С. После отмывки в лунки вносили по 100 мкл антител кролика против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000 в PBS на 1 ч при 37° С. Планшет еще раз отмывали и добавляли в лунки по 100 мкл раствора орто-фенилендиамина (1 мг/мл) в 1% цитратном буфере (рН 4,5), содержащего 0,05% перекиси водорода. Реакцию останавливали через 15 — 30 мин добавлением 100 мкл на лунку 1 М серной кислоты. Интенсивность реакции оценивали по величине оптического поглощения при 492 нм.

*Конкурентный твердофазный ИФА.* Антиген (конъюгат GMDP-AL, 20 мкг/мл) сорбировали как описано выше. Затем в лунки микропланшета вносили по 50 мкл конкурирующего агента в серийных двукратных разведениях в PBS и по 50 мкл иммунной мышьиной сыворотки или раствора МА в PBS в требуемом разведении. Планшет инкубировали 1—1,5 ч при 37° С, отмывали и далее анализ проводили как описано выше для твердофазного ИФА.

*Гибридизация.* Через 3 нед после четвертой иммунизации в течение 3 дней было проведено бустирование мыши с наиболее выраженным титром к GMDP (по 100 мкг GMDP-МеBSA на инъекцию, внутрибрюшинно, в физиологическом растворе). Гибридизацию иммунных спленоцитов мыши ( $5 \cdot 10^7$  клеток) с клетками миеломной линии SP2/0 проводили на следующий день после последнего бустирования по методике [16] при соотношении 5:1 с помощью 45% раствора полиэтиленгликоля 6000, содержащего 10% диметилсульфоксида. Гибридные клетки суспендировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки, в концентрации  $(2-5) \cdot 10^5$  клеток/мл и разносили в лунки четырех 96-луночных микропланшетов на фидерный слой перитонеальных мышшиных макрофагов. На следующий день половину культуральной среды в каждой лунке заменяли на среду HAT, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Положительные клоны отбирали на 10—14-е сут методом твердофазного ИФА.

*Аффинную колонку с иммобилизованным GMDP-лизином* на основе СН-сефарозы 4В приготавливали согласно инструкции фирмы-изготовителя [19]. Лиганд брали из расчета 40 мкг GMDP-лизина на 1 г СН-сефарозы.

*Очистка МА Еб/1.2 с помощью аффинной хроматографии.* Асцит (3 мл), разведенный равным объемом PBS (рН 7,4), или 200 мл гибридного супернатанта наносили на аффинную колонку с GMDP-лизином. Колонку промывали PBS со скоростью 0,8 мл/мин до исчезновения белка в элюате. Связавшиеся иммуноглобулины элюировали 100 мМ цитратным буфером (рН 3,0). Полученные фракции сразу нейтрализовали 1 М трис-НСl (рН 8,2), затем диализовали в течение ночи против PBS, добавляли 0,01%  $\text{NaN}_3$  и хранили при 4° С до использования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 59. № 4. P. 1317—1325.
2. Krueger J. M., Pappenheimer J. R., Karnovsky M. L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 19. P. 6102—6106.
3. Silverman D. H. S., Krueger J. M., Karnovsky M. L. // J. Immunol. 1986. V. 136. № 6. P. 2195—2201.

4. Кайдалов А. А., Уткин Ю. Н., Андропова Т. М., Цетлин В. И., Иванов В. Т.// Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1523—1529.
5. Tenu J.-P., Adam A., Souvannavong V., Yapo A., Petit J.-F., Douglas K.// Int. J. Immunopharm. 1989. V. 11. № 6. P. 653—661.
6. Richerson H. B., Adam P. A., Iwai Y., Barfknecht C. F.// Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1990. V. 2. P. 171—181.
7. Sege K., Peterson P. A.// Pros. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 5. P. 2443—2447.
8. Shechter Y., Maron R., Elias D., Cohen I. R.// Science. 1982. V. 216. № 4545. P. 542.
9. Farid N. R.// Anti-Idiotypes, Receptors, and Molecular Mimicry / Eds D. S. Linthicum, N. R. Farid. N. Y.: Springer-Verlag, 1988. P. 61—72.
10. Kohler H., Kaveri S., Kieber-Emmons T., Morrow W. J. W., Muller S., Raychaudhuri S.// Meth. Enzymol. 1989. V. 178. P. 179—340.
11. Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т.// Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843—1858.
12. Reichert C. M., Carelli C., Jolivet M., Audibert F., Lefrancier P., Chedid L.// Mol. Immunol. 1980. V. 17. P. 357—363.
13. Bahr G. M., Carelli C., Audibert F., Modabber F., Chedid L.// Mol. Immunol. 1982. V. 19. № 5. P. 737—745.
14. Bahr G. M., Eshhar Z., Ben-Yitzhak R., Modabber F. Z., Arnon R., Sela M., Chedid L.// Mol. Immunol. 1983. V. 20. № 7. P. 745—752.
15. Рап В. А., Махаров Е. А., Юровский В. В., Мещерякова Е. А., Андропова Т. М., Иванов В. Т.// Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 7. С. 905—915.
16. Kohler G., Milstein C.// Nature. 1975. V. 256. P. 495—497.
17. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
18. Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G.// J. Immunol. 1987. V. 100. P. 173—179.
19. Affinity Chromatography. Principles and Methods. 1979. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala. Sweden. P. 31—35.

Поступила в редакцию  
29. IX. 1992

После доработки  
1. XII. 1992

*T. Yu. Mareeva, O. V. Kotova, E. A. Makarov,  
T. M. Andronova, V. A. Nesmeyanov*

**MONOCLONAL ANTIBODY TO N-ACETYLGLUCOSAMINYL-( $\beta$ 1-4)-  
N-ACETYLMURAMYL-ALANYL-D-ISOGLUTAMINE:  
PREPARATION AND CHARACTERIZATION**

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov  
Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Hybridoma E6/1.2 was produced by fusion of splenocytes from mice immunized with N-acetylglucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-N-acetylmuramyl-alanyl-D-isoglutamine (GMDP), conjugated to methylated BSA, with SP2/0 myeloma cells. GMDP-specific monoclonal antibody was IgG1 subtype and had affinity constant  $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ . According to competitive ELISA, the presence of the intact disaccharide fragment and the alanyl residue was critical for the GMDP-antibody interaction.