



УДК 577.112.6.083.3:615.371

## ИНДУКЦИЯ ПРОТИВОМЕНИНГИТНОГО ИММУНИТЕТА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ III. ИММУНОАКТИВНЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ФРАГМЕНТЫ БЕЛКА NspA ИЗ *Neisseria meningitidis*

© 2002 г. Д. О. Короев<sup>\*,#</sup>, М. Б. Обозная<sup>\*</sup>, М. Н. Жмак<sup>\*</sup>, Т. Д. Волкова<sup>\*</sup>,  
М. А. Титова<sup>\*</sup>, О. В. Котельникова<sup>\*</sup>, О. Е. Лахтина<sup>\*</sup>, О. М. Вольпина<sup>\*</sup>,  
В. А. Несмеянов<sup>\*</sup>, А. П. Аллилуев<sup>\*\*</sup>, В. Т. Иванов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>\*\*</sup> НИИ общей и клинической патологии РУДН, Москва

Поступила в редакцию 08.02.2002 г. Принята к печати 15.03.2002 г.

С целью создания синтетической вакцины против менингококкового менингита серогруппы В синтезированы четыре потенциально иммуноактивных пептида – фрагменты белка NspA внешней мембраны бактерии *Neisseria meningitidis*. Проведена иммунизация мышей различных линий свободными пептидами, не конъюгированными с белком-носителем. Показано, что все синтезированные пептиды способны индуцировать у мышей образование противопептидных антител. В опытах по защите животных от гибели при экспериментальном заражении двумя штаммами *N. meningitidis* серогруппы В выявлен пептид, индуцирующий снижение числа бактерий в крови и защиту зараженных животных.

*Ключевые слова:* *Neisseria meningitidis*; NspA; синтетические пептиды; иммуногенность; протективная активность; бактериемия.

### ВВЕДЕНИЕ

Для вакцинации против менингита, вызываемого микроорганизмом *Neisseria meningitidis* серогрупп А и С, успешно применяются препараты, приготовленные на основе капсульного полисахарида [2]. В то же время капсульный полисахарид бактерии серогруппы В нельзя использовать для вакцинации в связи с подобием его структуры структуре гликопротеинов клеток нервной системы человека и эмбриональных тканей [3]. Наружная мембрана менингококка содержит большое число разнообразных белков, которые могут заменить капсульный полисахарид в вакцинирующем противоменингитном препарате [4]. Применение синтетических фрагментов этих белков является перспективным подходом к созданию эффективной вакцины против менингита В. Ра-

нее нами было показано, что синтетические пептиды, соответствующие фрагментам белков PrgA и OpaB внешней мембраны менингококка, способны защищать экспериментальных животных от заболевания менингитом В [1, 5]. Однако аминокислотная последовательность белков PrgA и OpaB различается у разных штаммов бактерии, кроме того, у разных штаммов значительно варьирует степень экспрессии белков OpaB [6, 7]. Поэтому представляет интерес выявление иммуноактивных и протективных фрагментов в последовательности высококонсервативных белков внешней мембраны менингококка.

Белок NspA – недавно обнаруженный минорный белок наружной мембраны менингококка, содержащий 155 а.о., высококонсервативен для всех серогрупп менингококка [8]. Известно, что антитела к NspA обладают бактерицидными и протективными свойствами [9, 10]. Таким образом, имеются предпосылки для использования синтетических фрагментов NspA при создании пептидной противоменингитной вакцины широкой специфичности. В данной работе было проведено исследование иммуногенных и протективных свойств синтетических пептидов с последовательностью фрагментов белка NspA.

Сообщение II см. [1].

Сокращения: КОЕ – колониеобразующие единицы; НАФ – неполный адъювант Фрейнда; ПАФ – полный адъювант Фрейнда; DIPС – *N,N'*-диизопропилкарбодимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMS – диметилсульфид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; НОВТ – 1-гидроксибензотриазол; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBS – 0.15 М раствор NaCl в 0.01 М растворе NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4).

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; эл. почта: koroev@ibch.ru).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гипотетическая модель расположения белка NspA в мембране представлена на рис. 1. Согласно этой модели, белок NspA имеет восемь трансмембранных районов и четыре экспонированных на наружной поверхности мембраны петли [11]. Эти петли имеют небольшую длину (от 10 до 16 а.о.).

Выбор фрагментов белка NspA для синтеза был осуществлен таким образом, чтобы пептиды содержали в своей последовательности теоретически рассчитанные мотивы для связывания с мышинными антигенами главного комплекса гистосовместимости II класса, т.е. включали бы потенциальные эпитопы Т-хелперов [12]. Аминокислотная последовательность четырех синтетических пептидов приведена на рис. 2. Выбранные для синтеза участки белка идентичны для всех штаммов *N. meningitidis* серогруппы В с известной аминокислотной последовательностью белка NspA [11].

В соответствии с гипотетической двумерной моделью белка NspA синтезированные пептиды (I) и (III) захватывают часть последовательности первой и третьей петлей, а пептиды (II) и (IV) полностью перекрывают вторую и четвертую петли белка (рис. 1). Таким образом, выбранные пептиды (I)–(IV) соответствуют не только расчетным Т-хелперным эпитопам, но и потенциальным В-эпитопам, расположенным в петлях белка NspA, экспонированных на поверхности наружной мембраны.

Пептиды (I)–(IV) получены твердофазным методом в ручном варианте путем наращивания цепи с С-конца на *n*-алкоксибензильном полимере [13]. Защитные группы боковых функциональных групп аминокислотных остатков выбраны с рас-

четом на конечное деблокирование трифторуксусной кислотой. Для защиты боковых функций остатков Thr, Tyr, Ser использовали  $Bu^t$ -группу, для Asp –  $OBu^t$ -группу, для Lys – Boc, для Arg – Pbf, для His – Trt-группы. Для временной  $N^\alpha$ -защиты была использована Fmoc-группа.

Для наращивания полипептидной цепи на полимере применяли DIPС–НОВТ-метод. Отщепление пептидов от полимера с одновременным деблокированием осуществляли смесью трифторуксусной кислоты с добавками, предотвращающими протекание побочных реакций. После деблокирования пептиды обессоливали с помощью гель-фильтрации и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Синтез пептидов проводили исходя из 300 мг *n*-алкоксибензильного полимера, после окончания синтеза масса пептидполимера возрастала в 2–3 раза, и деблокированию подвергали аликвоту пептидполимера 300 мг. Выход пептидов составил 40–130 мг (60–80% в расчете на содержание гидроксильных групп в исходном полимере).

Индивидуальность полученных соединений подтверждена данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Способность синтетических пептидов в свободном состоянии, без конъюгации с белком-носителем, вызывать образование антител была изучена при иммунизации мышей трех линий: Balb/c, СВА и С57В1/6, различающихся по гаплотипу (H-2<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup> и H-2<sup>b</sup> соответственно). Животных иммунизировали дважды и полученные сыворотки исследовали на наличие противопептидных антител методом твердофазного ИФА (табл. 1).

Полученные результаты показали, что все пептиды проявили способность индуцировать об-

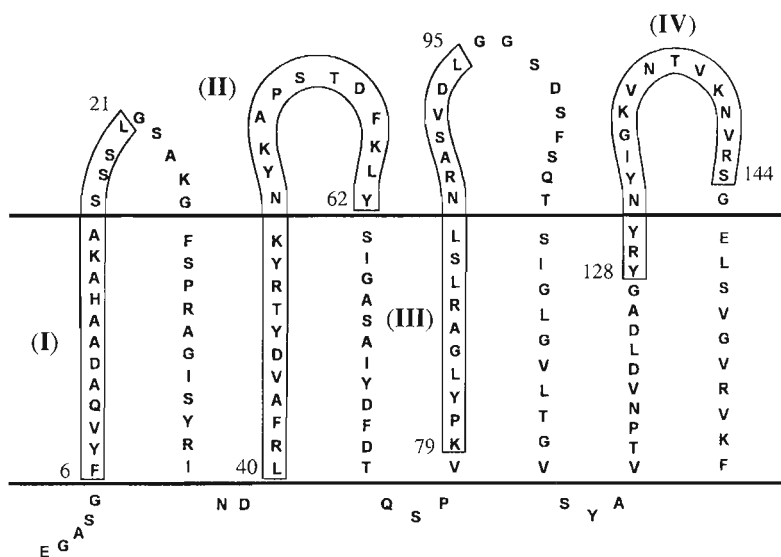


Рис. 1. Гипотетическая модель расположения белка NspA в наружной мембране [11]. Выделены синтезированные фрагменты белка.

разование антител: пептиды (II) и (IV) – у мышей всех трех линий, а пептиды (I) и (III) – у мышей двух линий – СВА и С57В1/6. Наличие гуморального иммунного ответа на данные пептиды говорит о том, что они действительно содержат эпитопы, активирующие Т-хелперные клетки.

Синтетические пептиды проявили иммуногенную активность в разной степени. Пептид (I) на мышцах линий СВА и С57В1/6 оказался высокоиммуногенным (титр пула >3.0\* – см. табл. 1), а у мышей линии Balb/c вообще не вызвал образования антител. Пептиды (II) и (IV) проявили высокую иммуногенную активность на мышцах линий Balb/c и С57В1/6 и низкую (титр пула <3.0) – на мышцах линии СВА. Пептид (III) не был иммуногенен на мышцах Balb/c и проявил низкую иммуногенность на мышцах линии СВА и С57В1/6.

Исследование индивидуальных сывороток мышей показало, что у животных одной линии, иммунизированных одним и тем же пептидом, иммунный ответ развивался с разной интенсивностью. В группах мышей с титром антител пула менее 3.0 у некоторых животных иммунизация вообще не приводила к образованию антител. В то же время в группах животных с высокими титрами антител пула разброс в значениях титров индивидуальных сывороток был незначителен. Например, при иммунизации мышей линии Balb/c пептидом (II) титр пула имеет значение 4.8, а титр антител у отдельных животных варьирует от 4.2 до 5.1 (табл. 1).

Для исследования протективной активности была изучена способность пептидов (I)–(IV) индуцировать защиту мышей линии СВА при экспериментальном заражении летальной дозой менингококка. Также была проведена оценка бактериемии в крови мышей через 3 ч после введения бактерий. Для заражения использовали два штамма *N. meningitidis* серогруппы В – Н44/76 и 2394, относящихся к различным серосубтипам.

Мышей линии СВА иммунизировали пептидами (I)–(IV) в ПАФ, в качестве контроля использовали иммунизацию ПАФ и через месяц заражали летальной дозой живой вирулентной культуры менингококка. Через 3 ч у мышей отбирали образцы крови, наносили на питательную среду и через 18–20 ч проводили подсчет числа выросших колоний бактерий индивидуально для каждой мыши.

В табл. 2 приведены усредненное число КОЕ для каждой группы мышей, а также число мышей в каждой группе с низким содержанием КОЕ в крови (<50% от контроля). В крови животных, иммунизированных пептидом (II), наблюдалось наименьшее число КОЕ. При заражении штаммом Н44/76 число КОЕ отличалось от контроль-

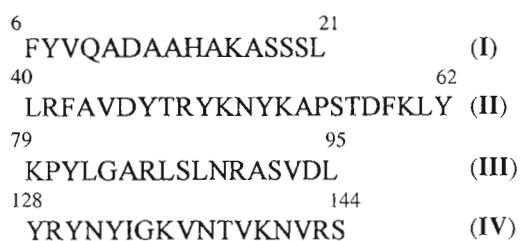


Рис. 2. Аминокислотная последовательность пептидов (I)–(IV) – синтетических фрагментов белка NspA.

ных значений в 10.5 раз и было меньше 50% от контроля у четырех из пяти мышей, а при заражении штаммом 2394 – в 3.5 раза и было меньше 50% от контроля у трех из шести мышей. При иммуни-

Таблица 1. Титры противопептидных антител в сыворотках мышей после двукратной иммунизации синтетическими фрагментами белка NspA (метод твердофазного ИФА)

Фрагмент белка	Номер животного	Титр противопептидных антител, –lg		
		Balb/c	СВА	С57В1/6
6–21 (I)	1	<1.0	2.5	3.1
	2	<1.0	3.5	3.1
	3	<1.0	1.6	3.4
	4	<1.0	3.1	3.1
	5	–*	2.9	–
	<b>Пул</b>	<b>&lt;1.0</b>	<b>3.5</b>	<b>3.2</b>
40–62 (II)	1	5.1	1.6	3.5
	2	4.2	<1.0	3.8
	3	4.5	3.1	4.2
	4	5.1	3.1	4.2
	5	–	2.2	3.8
	<b>Пул</b>	<b>4.8</b>	<b>2.5</b>	<b>4.1</b>
79–95 (III)	1	<1.0	1.6	2.5
	2	<1.0	2.5	2.2
	3	<1.0	2.5	2.2
	4	<1.0	<1.0	<1.0
	5	–	<1.0	–
	<b>Пул</b>	<b>&lt;1.0</b>	<b>2.0</b>	<b>2.2</b>
128–144 (IV)	1	3.1	2.2	1.9
	2	2.2	2.8	3.5
	3	2.8	1.3	2.6
	4	3.2	1.3	3.5
	5	2.5	1.6	–
	<b>Пул</b>	<b>3.2</b>	<b>2.5</b>	<b>3.5</b>

\* Здесь и далее значения титров выражены в отрицательных десятичных логарифмах разведения сыворотки.

\* В данном эксперименте иммунизировали группу из четырех мышей.

**Таблица 2.** Протективная активность синтетических фрагментов белка NspA

Фрагмент белка	Штамм Н44/76			Штамм 2394		
	Среднее число КОЕ	Количество мышей с КОЕ <50% от контроля	Число выживших/общее число мышей в группе	Среднее число КОЕ	Количество мышей с КОЕ <50% от контроля	Число выживших/общее число мышей в группе
6–21 (I)	380	0/5	1/5	313	0/6	0/6
40–62 (II)	48	4/5	3/5	130	3/6	2/6
79–95 (III)	310	1/5	2/5	280	0/6	2/6
128–144 (IV)	290	0/5	1/5	325	0/6	0/6
Контроль	510	0/5	0/5	467	0/6	0/6

зации остальными пептидами число КОЕ отличалось от контрольных значений менее чем в 2 раза и у всех мышей кроме одной (иммунизированной пептидом (III) и зараженной штаммом Н44/76).

Учет количества выживших после заражения менингококком мышей (табл. 2) показал, что при заражении бактериями штамма Н44/76 пяти животных, иммунизированных пептидом (II), трое из них выжили. В случае иммунизации пептидом (III) только двое животных остались живы. В то же время в группах, иммунизированных пептидами (I) и (IV), выжило по одному животному из пяти. При заражении штаммом 2394 иммунизация пептидами (I) и (IV) не оказала защитного действия, а иммунизация каждым из пептидов (II) и (III) стимулировала протективный эффект у двух из шести мышей. В то же время в контрольной группе мышей, получивших только инъекцию ПАФ, погибли все животные.

Таким образом, в случае пептидов (I), (II) и (IV) данные изучения протективной активности хорошо коррелировали с результатами измерения бактериемии. Проявивший наиболее выраженную протективную активность пептид (II) эффективно подавлял размножение бактерий в крови иммунизированных животных, а пептиды (I) и (IV) не индуцировали защиту мышей и не подавляли бактериемии. В то же время пептид (III) проявлял протективную активность, хотя и в меньшей степени, чем пептид (II), но не был способен эффективно подавлять бактериемиию.

**Таблица 3.** Влияние числа иммунизаций мышей пептидом 40–62 (II) на количество КОЕ в крови животных, зараженных бактериями штамма Н44/76

Число иммунизаций	Титр противопептидных антител, –lg	Среднее число КОЕ	Число выживших/общее число мышей в группе
1	<1.0	44	4/5
2	3.2	21	4/5
3	4.2	42	4/5

Для выяснения механизмов индукции наиболее активным пептидом (II) протективного иммунитета представляло интерес исследовать, является ли стимулируемый эффект антителозависимым. Для этого были проведены однократная, двукратная или трехкратная иммунизация мышей СВА пептидом (II) и изучен уровень противопептидных антител в крови иммунизированных животных и число КОЕ после их заражения менингококком (табл. 3). Как показали результаты испытаний, увеличение числа иммунизаций приводит к росту титра противопептидных антител от значения <1.0 для однократной иммунизации до 4.2 при трехкратной иммунизации. При этом уровень противопептидных антител не коррелировал с количеством бактерий в крови: при любой кратности иммунизаций число КОЕ существенно не изменялось. Одно из возможных объяснений наблюдаемого эффекта заключается в клеточном механизме индуцируемого пептидом протективного иммунитета.

Ранее методом адаптивного переноса лимфоцитов иммунных животных интактным реципиентам нами было показано, что Т-клетки играют едва ли не главную роль в формировании противоменингитного иммунитета у переболевших менингококковым менингитом серогруппы В мышей, причем в формировании защиты в одинаковой степени были эффективны и CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты [14]. Аналогичные результаты были получены нами при переносе Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных пептидом 118–143 белка PorA (неопубликованные данные). Поскольку защитный эффект Т-клеток не может объясняться их прямым действием на бактериальные клетки, очевидно, противоменингитная защита обеспечивается активацией клеточных фагоцитов природного звена иммунитета, нейтрофилов и макрофагов. Подобная активация протектует под действием Т-клеточных цитокинов, фактора-α некроза опухолей и интерферона-γ.

Таким образом, из четырех изученных синтетических фрагментов белка NspA пептид (II) индуцирует наиболее эффективный противоменингокок-

ковый иммунитет. Иммунизация мышей данным пептидом приводит к уменьшению количества бактерий в крови после заражения двумя различными штаммами менингококка серогруппы В, а также наблюдается снижение числа летальных исходов по сравнению с контрольными животными. Поэтому можно утверждать, что пептид (II) перспективен для дальнейших исследований, связанных с разработкой вакцины против *N. meningitidis* серогруппы В. Следует отметить, что пептид (III) также проявил протективную активность, хотя и более низкую, чем пептид (II). Однако пептид (III) не был способен стимулировать снижение бактериемии, поэтому дальнейшие перспективы его использования связаны с дополнительными исследованиями.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы для пептидного синтеза и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), алкоксибензильный полимер (Merck, ФРГ). Для обессоливания применяли сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция). Для ВЭЖХ использовали хроматограф System Gold (Beckman, США), колонки Phenomenex JUPITER 5 $\mu$  C18 300A 4.6  $\times$  250 мм, 5 мкм, для аналитической хроматографии и Phenomenex JUPITER 10 $\mu$  C18 300A 10  $\times$  250 мм, 10 мкм, для препаративной. Гидролиз пептидов проводили смесью 6 н. HCl-TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Растворители очищали согласно известным методикам [15]. Масс-спектрометрию выполняли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ).

В иммунохимических исследованиях применяли ПАФ и НАФ (Sigma, США), козы антитела против иммуноглобулинов мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 96-луночные платы из полистирола (Nunc Maxi-sorb, Дания). Для иммунизации использовали самок мышей линий Balb/c, C57Bl/6, CBA весом 18–20 г. Для заражения применяли менингококк штаммов H44/76 В : 15 : P1.7; 16 и 2394 (2a : P1.2), выращенный в Институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

**Твердофазный синтез пептидов** проводили на *n*-алкоксибензильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.37 ммоль/г. Полимер промывали DMF, эфиром и высушивали. Полимер (300 мг) суспендировали в 10 мл DMF. В 5 мл DMF растворяли 10 экв. стартовой Fmoc-защитенной аминокислоты, 100 мг НОВТ (10 экв.), к перемешиваемому раствору добавляли 115 мкл DIPС (10 экв.), раствор перемешивали 10 мин при 0°C. Полученный раствор вместе с 1 мг DMAP (0.1 экв.) добавляли к суспензии полимера и перемешивали в течение 4 ч. По окончании реакции полимер отфильтровывали,

промывали DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и ацилировали непрореагировавшие гидроксильные группы 5 мл смеси Ac<sub>2</sub>O–пиридин–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 : 20 : 60) 1 ч, после чего полимер промывали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, изопропанолом и снова CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Наращивание полипептидной цепи вели по следующему протоколу операций для каждого синтетического цикла (при расходе 5–7 мл растворителя на 200 мг исходного полимера): 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2  $\times$  2 мин); 2) DMF (2  $\times$  2 мин); 3) 20% пиперидин в DMF (20 мин); 4) DMF (2  $\times$  2 мин); 5) диоксан–вода, 2 : 1 (2  $\times$  5 мин); 6) DMF (3  $\times$  2 мин); 7) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  2 мин); 8) DMF (2  $\times$  2 мин); 9) 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 10) DMF (2  $\times$  2 мин); 11) 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 12) DMF (2  $\times$  2 мин); 13) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2  $\times$  2 мин); 14) ацилирование: Ac<sub>2</sub>O–пиридин–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 : 20 : 60 (30 мин); 15) изопропанол (3  $\times$  2 мин); 16) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  2 мин); 17) DMF (3  $\times$  2 мин).

Для преактивации аминокислот к раствору 3 экв. Fmoc-защитенной аминокислоты и 3 экв. НОВТ в 5 мл DMF приливали 3 экв. DIPС, раствор перемешивали 10 мин при 0°C. Контроль за содержанием непрореагировавших аминогрупп проводили с помощью нингидринового и пикринового тестов после операции 13 синтетического протокола [16, 17]. При положительном нингидриновом или, в случае *N*-концевого Pro, пикриновом тестах цикл конденсации (операции 10–13) повторяли.

Отщепление пептида от полимера с одновременным деблокированием проводили на 300 мг пептидполимера в 3 мл смеси TFA–этандитиол–DMS–*m*-крезол в объемном соотношении 91 : 3 : 3 : 3 в течение 2 ч, раствор пептида в TFA отфильтровывали от полимера, затем TFA упаривали при пониженном давлении. Пептид осаждали 100 мл этилового эфира, продукт отщепления отфильтровывали и промывали эфиром (5  $\times$  20 мл). Осадок перемешивали в 5 мл 10% AcOH 20 мин, отфильтровывали и промывали 5 мл 10% AcOH. Полученный раствор пептида лиофилизировали и обессоливали на колонке 2.5  $\times$  60 см с сефадексом G-10 в 0.1 М AcOH. Пептиды очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TFA от 10 до 70% за 60 мин при расходе элюента 3 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм.

Синтезированные пептиды характеризовали данными аналитической ВЭЖХ, аминокислотного анализа и масс-спектрометрии. Аналитическую ВЭЖХ проводили в градиенте ацетонитрила в 0.1% TFA от 10 до 70% ацетонитрила за 60 мин при расходе элюента 1 мл/мин, поглощение элюата регистрировали при длине волны 226 нм. Времена удерживания пептидов при аналитической ВЭЖХ и найденные молекулярные массы представлены в табл. 4. Все пептиды имели корректный аминокислотный состав.

**Таблица 4.** Времена удерживания пептидов в условиях аналитической ВЭЖХ, молекулярные массы пептидов и данные МС

Пептид	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
		вычисленная	по данным МС ( $M^+$ )
(I)	20.8	1665.8	1666.3
(II)	28.1	2860.3	2860.6
(III)	18.5	1873.2	1873.6
(IV)	14.3	2075.7	2075.3

**Иммунизация животных.** Каждым пептидом, в зависимости от эксперимента, иммунизировали однократно, двукратно или трехкратно группы из четырех–шести животных. Двукратную иммунизацию мышей трех линий с интервалом в 45 сут проводили пептидами (I)–(IV) и для изучения уровня противопептидных антител отбирали кровь через 10 сут после второй иммунизации тотально. Пептидами (I)–(IV) для изучения их протективной активности однократно иммунизировали мышей СВА. При исследовании влияния числа иммунизаций на активность пептида (II) проводили однократную, двукратную, с интервалом в 30 сут, либо трехкратную, с интервалами в 20 и 10 сут соответственно, иммунизацию мышей СВА. В этом случае кровь отбирали из ретроорбитального синуса через 25 сут после последней иммунизации.

Для получения иммунизирующего состава готовили растворы пептидов в PBS в концентрации 2 мг/мл. Раствор пептида смешивали до получения эмульсии с равным объемом ПАФ для первой иммунизации или НАФ для второй и третьей иммунизации. Пептиды вводили в дозе 100 мкг (0.1 мл эмульсии) подкожно в основание хвоста. Отобранную в пробирки кровь оставляли на ночь при +4°C для образования сгустка клеток. Затем проводили центрифугирование 10 мин при 2.5 тыс. об/мин и отбирали сыворотку. Для анализа общего иммунного ответа линии мышей готовили пул: отбирали в отдельную пробирку по 20 мкл сывороток, полученных от каждой из мышей в группе. Сыворотки хранили при температуре –20°C.

**Твердофазный ИФА** проводили как описано в работе [1]. За титр противопептидных антител принимали отрицательный логарифм (–lg) значения разведения сыворотки, дающего поглощение более 0.1 ОЕ ( $\lambda = 492$  нм) и превышающего фоновый уровень более чем в два раза. За фоновый уровень принимали оптическое поглощение сывороток неиммунизированных мышей.

**Оценка протективной активности пептидов.** Через месяц после иммунизации пептидами (I)–(IV) мышей СВА заражали живой вирулентной культурой менингококка в дозе  $10^8$  микробных

клеток. Для заражения использовали два штамма менингококка серогруппы В, отличающихся по серотипу: Н44/76 (В15 : Р1.7;16) и 2394 (2а : Р1.2). Мышей заражали внутрибрюшинно четырехчасовой культурой микробов в растворе железного декстрана (Sigma, США) или цитрата железа (Sigma, США) из расчета 800 мкг железа на мышь. Контролем служили животные, получавшие только инъекцию ПАФ. Протективную активность пептидов оценивали по числу выживших животных.

**Оценка бактериемии у мышей.** Иммунизированных и контрольных мышей через месяц после последней иммунизации заражали, как описано выше, живой культурой менингококка одного или двух штаммов в дозе  $10^8$  микробных клеток. Через 3 ч после заражения у каждой мыши забирали 5 мкл крови из ретроорбитального синуса, разводили в PBS в 62 раза, и 50 мкл разведенной крови высевали на чашки с твердой питательной средой и выращивали в термостате при температуре 37°C в атмосфере 5.7% CO<sub>2</sub>. Через 18–20 ч проводили визуальный учет числа КОЕ.

Работа поддержана межведомственной научно-технической программой “Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Короев Д.О., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Куприянова М.А., Несмеянов В.А., Аллилуев А.П., Котельникова О.В., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 2001. Т. 27. С. 21–26.
2. Gotschlich E.C., Liu T.Y., Artenstein M.S. // J. Exp. Med. 1969. V. 129. P. 1349–1365.
3. Finne S., Bitter-Suerman D., Goridis C., Finne U. // J. Immunol. 1987. V. 138. P. 4402–4407.
4. Poolman J.T. // Inf. Agents Dis. 1995. V. 4. P. 13–28.
5. Короев Д.О., Котельникова О.В., Вольпина О.М., Жмак М.Н., Куприянова М.А., Агафонова С.А., Аллилуев А.П., Литвинов И.С., Несмеянов В.А., Иванов В.Т. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 323–329.
6. Aho E.L., Dempsey J.A., Hobbs M.M., Clapper D.G., Cannon J.G. // Mol. Microbiol. 1991. V. 5. P. 1429–1437.
7. Tinsley C.R., Heckels J.E. // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. P. 2483–2490.
8. Martin D., Cadieux N., Hamel J., Brodeur B.R. // J. Exp. Med. 1997. V. 185. P. 1173–1183.
9. Martin D., Brodeur B.R., Hamel J., Couture F., Alwis U., Lian Z., Martin S., Andrews D., Ellis R.W. // J. Biotechnol. 2000. V. 83. P. 27–31.
10. Cadieux N., Plante M., Rioux C.R., Hamel J., Brodeur B.R., Martin D. // Infect. Immun. 1999. V. 67. P. 4955–4959.
11. Moe G.R., Tan S., Granoff D.M. // Infect. Immun. 1999. V. 67. P. 5664–5675.
12. Rammensee H.-G., Friede T., Stevanović S. // Immunogenetics. 1995. V. 41. P. 178–228.

13. Udenfriend S., Meienhofer J. *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. London: Academic Press, Inc., 1987. V. 9. P. 27–30.
14. Несмеянов В.А., Вольпина О.М., Котельникова О.В., Короев Д.О., Жмак М.Н., Титова М.А., Волкова Т.Д., Обозная М.Б., Литвинов И.С., Аллилуев А.П., Королева И.С., Иванов В.Т. Современные аспекты аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии. Сб. трудов 4-го Конгресса РААКИ. 2001. Т. 1. С. 357–374.
15. Perrin D.D. *Purification of Laboratory Chemicals*. N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 563.
16. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B. // *Anal. Biochem.* 1981. V. 117. P. 147–157.
17. Gisin B.F. // *Anal. Chim. Acta.* 1972. V. 58. P. 248–249.

## Induction of Antimeningitis Immunity by Synthetic Peptides. III. Immunoactive Synthetic Fragments of the NspA Protein from *Neisseria meningitidis*

D. O. Koroev<sup>#</sup>, M. B. Oboznaya\*, M. N. Zhmak\*, T. D. Volkova\*,  
M. A. Titova\*, O. V. Kotel'nikova\*, O. E. Lakhtina\*, O. M. Vol'pina\*,  
V. A. Nesmeyanov\*, A. P. Alliluev\*\*, and V. T. Ivanov\*

<sup>#</sup>Phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: koroev@ibch.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

\*\*Institute of General and Clinical Pathology, Peoples' Friendship University of Russia,  
ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117997 Russia

Four potentially immunoactive peptide fragments of the NspA protein from the outer membrane of the bacterium *Neisseria meningitidis* were synthesized in order to create a synthetic vaccine against the meningococcal infection by the serogroup B bacterium. Mice of various lines were immunized with the free peptides nonconjugated with a protein carrier. All the synthetic peptides were shown to induce the production of the anti-peptide antibodies in mice. A peptide capable of inducing a decrease in the number of bacteria in blood and the protection of infected animals from death was found in the experiments on the protection of the animals infected with two strains of the *Neisseria meningitidis* serogroup B. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* bacteremia, immunogenicity, *Neisseria meningitidis*, NspA, protective activity, synthetic peptides