



УДК 577.112.6

ИНДУКЦИЯ ПРОТИВОМЕНИНГИТНОГО ИММУНИТЕТА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ. I. ИММУНОАКТИВНЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ФРАГМЕНТЫ БЕЛКА ПОРИНА А ИЗ *Neisseria meningitidis*

© 2000 г. Д. О. Короев[#], О. В. Котельникова, О. М. Вольпина, М. Н. Жмак, М. А. Куприянова,
С. А. Агафонова, А. П. Аллилуев*, И. С. Литвинов, В. А. Несмеянов, В. Т. Иванов

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

* НИИ общей и клинической патологии РУДН, Москва

Поступила в редакцию 13.10.99 г. Принята к печати 16.12.99 г.

Синтезировано 14 пептидов, соответствующих последовательности всех экспонированных участков и части трансмембранных районов белка порина А (PorA) внешней мембраны *Neisseria meningitidis* штамма В:15:P1.7,16. Проведена иммунизация мышей различных линий незащищенными пептидами без конъюгации с белком-носителем. Показано, что большинство пептидов проявляет иммуногенные свойства. Обнаружено два пептида, с которыми связываются антитела, присутствующие в сыворотке крови переболевших менингитом мышей. Изучены протективные свойства ряда синтезированных пептидов; выявлены три последовательности, индуцирующие защиту мышей от заболевания при экспериментальном заражении культурой *N. meningitidis*.

Ключевые слова: *Neisseria meningitidis*, PorA, синтетические пептиды; иммуногенность, протективная активность.

Около 90% всех заболеваний менингококковым менингитом в разных странах вызываются штаммами *Neisseria meningitidis* серогрупп А, В и С [1]. Разработаны эффективные вакцины на основе капсульного полисахарида бактерии против *N. meningitidis* серогрупп А и С [2]. Попытки использования капсульного полисахарида *N. meningitidis* серогруппы В для создания вакцины натолкнулись на серьезные трудности. Структура полисахарида В сходна со структурой углеводной компоненты гликопротеина NCAM (neural cell adhesion molecule) клеток периферической и центральной нервной системы млекопитающих, а также некоторых эмбриональных тканей [3]. В результате при вакцинации полисахаридом В возникает опасность развития аутоиммунных заболеваний или повреждения плода в результате проникновения специфичных к В-полисахариду IgG-антител через гематоплацентарный барьер

[4]. Это вызывает необходимость разработки альтернативных путей создания вакцины против *N. meningitidis* серогруппы В.

Помимо капсульного полисахарида во внешней мембране *N. meningitidis* присутствует ряд белков, которые подразделяются на 5 классов и несут тип-субтиповые маркеры. Показано, что направленные к этим белкам антитела бактерицидны, обладают опсонизирующим действием и протективными свойствами [5]. Один из перспективных путей создания противоменингитной вакцины заключается в использовании для этих целей синтетических фрагментов белков наружной мембраны, ответственных за стимуляцию антибактериального иммунитета. Такой подход дает возможность проводить вакцинацию неинфекционными, химически индивидуальными соединениями, индуцирующими строго направленный иммунный ответ. Синтетические фрагменты белков могут включать не только переменные, но и константные участки, способные формировать иммунитет к широкому кругу штаммов *N. meningitidis*.

Данная работа – часть комплексного исследования, направленного на создание искусственной вакцины против менингококковой инфекции серогруппы В, основанной на синтетических фрагментах белков внешней мембраны менингокок-

Сокращения: DiEA – *N*-диизопропилэтиламин; DIPC – *N,N'*-диизопропилкарбодимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMS – диметилсульфид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; НОВТ – 1-гидроксибензотриазол; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBS – 0.01 М раствор NaH_2PO_4 (рН 7.4); PorA – порин А; TBUTU – тетрафторборат 2-(1H-бензо-триазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилмочевины.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-57-77; e-mail: fmdv@ibch.siobc.ras.ru).

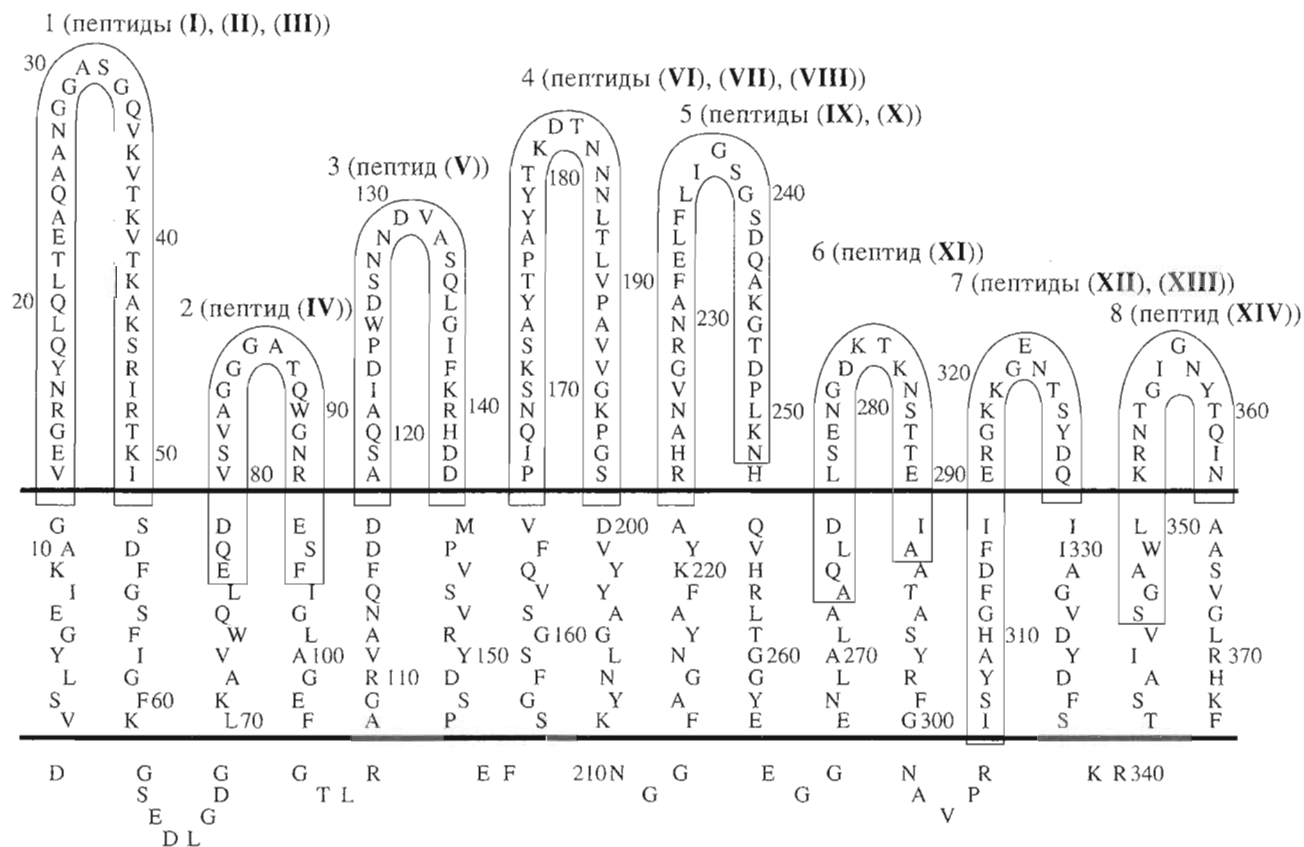


Рис. 1. Схема расположения субъединицы белка PorA во внешней мембране бактерии *Neisseria meningitidis*. Выделены участки, перекрытые синтетическими пептидами. Показана нумерация экспонированных петель и соответствующих им пептидов.

ка, и посвящена синтезу и изучению антигенных, иммуногенных и протективных свойств фрагментов порина A (PorA) – белка класса I наружной мембраны *N. meningitidis* штамма 44/76 (Норвегия), имеющего фенотип B:15:P1.7,16:L3,7.

PorA представлен во внешней мембране в виде комплекса, состоящего из трех идентичных субъединиц [6]. Известно, что против него вырабатываются антитела, обладающие высокой бактерицидной активностью и обеспечивающие защиту от летального заражения лабораторных животных *N. meningitidis* [5]. Подобной активностью обладают и моноклональные антитела, полученные к PorA [7]. Предложена гипотетическая модель расположения субъединицы белка во внешней мембране бактерии, в соответствии с которой полипептидная цепь PorA имеет восемь гидрофильных петель, экспонированных на поверхности мембраны, и 16 гидрофобных трансмембранных участков (рис. 1) [8].

Ранее синтетические пептиды были использованы рядом авторов для изучения роли участков полипептидной цепи PorA в стимуляции противоменингитного иммунитета [9, 10]. Так, используя наборы пептидов с перекрывающимися последо-

вательностями и сыворотки добровольцев, иммунизированных норвежской везикулярной вакциной, Дельвиг с соавт. показали, что иммунодоминантными B-клеточными эпитопами PorA являются 1-я и 4-я петли (см. рис. 1) молекулы [11]. Оказалось, что пептидные фрагменты 4-й петли способны индуцировать выработку бактерицидных антител к *N. meningitidis* у мышей и кроликов, однако эффект достигался лишь при конъюгации пептида с белком-носителем или его циклизации [12–14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе объектами синтеза были выбраны участки белковой цепи PorA, перекрывающие последовательность всех экспонированных петель и захватывающие часть трансмембранных районов (выделены на рис. 1). Аминокислотные последовательности этих пептидов приведены на рис. 2. Длинным петлям, таким, как 1-я, 4-я и 5-я соответствуют два-три перекрывающихся пептида, коротким петлям – один пептид.

Для исследования свойств 4-й петли наряду с пептидами (VI) и (VIII), полностью перекрываю-

щими последовательность этой петли, был синтезирован более короткий пептид (VII) с последовательностью 178–187. Два пептида соответствуют высококонсервативной 7-й петле: пептид (XII), захватывающий весь трансмембранный участок и часть выступающей петли, и пептид (XIII), охватывающий всю петлю и часть трансмембранного участка. Кроме того, пептид (XII) имеет в своей последовательности замену Phe³¹⁴ → Leu, которая встречается в белках PorA у 50% всех известных штаммов менингококка серогруппы B.

Выбранные для синтеза пептиды содержат в своей последовательности участки PorA, проявившие активность в экспериментах по стимуляции *in vitro* Т-клеток крови вакцинированных норвежской менингитной вакциной добровольцев [9]. Кроме того, пептиды (III), (V), (IX)–(XIV) включают мотивы для связывания с мышинными антигенами главного комплекса гистосовместимости II класса локуса I-E [15], т.е. потенциальные Т-хелперные эпитопы. Пептиды (IV), (IX), (XII)–(XIV) содержат эпитопы Т-хелперов человека, рассчитанные для некоторых аллотипов антигенов главного комплекса гистосовместимости локусов HLA-DR, DP, DQ [15].

Пептиды (I)–(XIV) получены твердофазным методом в ручном варианте путем наращивания цепи с С-конца на *n*-алкоксибензильном полимере [16]. Защитные группы боковых функциональных групп аминокислотных остатков выбраны с расчетом на конечное деблокирование трифторуксусной кислотой. Для защиты боковых функций остатков Thr, Tyr, Ser использовали *Bu*^t-группу, для Asp, Glu – *OBu*^t-группу, для Lys – Boc, для Arg – Pbf, для His – Trt-группы. В качестве временной *N*^α-защиты служила Fmoc-группа.

Для наращивания полипептидной цепи на полимере применяли TBTU-метод. Реакцию конденсации проводили дважды. После второй конденсации осуществляли контроль непрореагировавших аминогрупп и при неудовлетворительном результате конденсацию повторяли до полноты протекания реакции более 99%. Каждый цикл синтеза заканчивали ацетилированием оставшихся непрореагировавших аминогрупп с помощью уксусного ангидрида.

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

12	31	
VEGRNYQLQLTEAQAANGGA		(I)
22	41	
TEAQAANGGASGQVKVTKVT		(II)
32	51	
SGQVKVTKVTKAKSRIRTKI		(III)
77	96	
EQDVSVAGGGATQWGNRESF		(IV)
118	143	
ASQAIDPWDSNNDVASQLGIFKRHDD		(V)
166	187	
PIQNSKSA YTPAYYTKDTNNNL		(VI)
178	187	
YYTKDTNNNL		(VII)
178	199	
YYTKDTNNNLTLVPAVVGKPGS		(VIII)
223	242	
RHANVGRNAFELFLIGSGSD		(IX)
233	252	
ELFLIGSGSDQAKGTDPLKN		(X)
273	292	
AQLDLSENGDKTKNSTTEIA		(XI)
306	321	
ISYANGFDLIERGKKG		(XII)
311	328	
GDFFIERGKKGENTS YDQ		(XIII)
346	363	
SGAWLKRNTGIGNYQIN		(XIV)

Рис. 2. Синтетические фрагменты белка PorA из *Neisseria meningitidis*. Показаны номера остатков соответствующих фрагментов полипептидной цепи.

(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 синтезированных пептидов стимулировать образование антител была изучена в экспериментах на мышах линий Balb/c, C₅₇/Bl и CBA/La, различающихся по гаплотипу. Мышей дважды иммунизировали незащищенными пептидами без их конъюгации с белком-носителем. Полученные сыворотки исследовали методом ИФА на связывание с пептидами, сорбированными на планшете. В случае отсутствия связывания сывороток мышей всех трех линий для подтверждения отрицательных результатов, которые могли быть обусловлены плохой сорбцией пептида, наносили на плашку конъюгаты пептидов с овальбумином.

Результаты испытаний показали (табл. 1), что из 14 синтезированных пептидов 10 индуцировали гуморальный ответ хотя бы на одной линии мышей. Следовательно, эти пептиды содержат эпитопы, активирующие Т-хелперные клетки. Полученные данные хорошо согласуются с расчетными Т-эпитопами, представляемыми антигенами гистосовместимости II класса мышей локуса H-2E [15]. Лишь один из потенциально актив-

Таблица 1. Иммуногенная активность синтетических пептидов – фрагментов белка P_{ogA} в экспериментах на мышцах различных линий

Иммуноген	Титр противопептидных антител		
	Valb/c	C ₅₇ /Bl	CBA/La
12–31 (I)	<10	<10	<10
22–41 (II)	<10	<10	13200*
32–51 (III)	13200	20	13200
77–96 (IV)	<10	<10	<10
118–143 (V)	3200	1320	1600
166–187 (VI)	1600	13200	<10
178–187 (VII)	<10	<10	<10
178–199 (VIII)	<10	<10	13200*
223–242 (IX)	<10	<10	160
233–252 (X)	6400	640	<10
273–292 (XI)	<10	<10	<10
306–321 (XII)	6400	640	6400
311–328 (XIII)	32000	320	6400
346–363 (XIV)	3200	<10	1320

* Титр антител определяли за 30-е сутки после 2-й иммунизации.

Таблица 2. Наличие антител к синтетическим пептидам в сыворотках мышей после сублетального заражения менингококком

Антиген	Титр антител		
	Срок после заражения мышей		
	21 сут	30 сут	4 мес.
12–31 (I)	<10	<10	<10
22–41 (II)	<10	<10	<10
32–51 (III)	<10	<10	<10
77–96 (IV)	<10	<10	<10
118–143 (V)	<10	<10	<10
166–187 (VI)	<10	<10	<10
178–199 (VIII)	640	320	40
223–242 (IX)	<10	<10	<10
233–252 (X)	<10	<10	<10
273–292 (XI)	<10	<10	<10
311–328 (XIII)	<10	<10	80
346–366 (XIV)	<10	<10	<10

ных пептидов (пептид (XI)) не обнаружил иммуногенных свойств. В то же время иммуногенные свойства проявили пептиды (VI) и (VIII), не содержащие расчетных Т-эпитопов. Возможно их активность реализовалась за счет взаимодействия с антигенами гистосовместимости II класса мышей локуса I-A, для которых не описан

мотив связывания. Проявившие иммуногенные свойства пептиды (IX), (XII)–(XIV) содержат, как сказано выше, мотивы связывания с антигенами ряда аллотипов главного комплекса гистосовместимости II класса человека [15], что позволяет надеяться на проявление этими пептидами активности в составе вакцинных препаратов, предназначенных для защиты людей.

Для выявления среди синтезированных пептидов соединений, содержащих В-эпитопы, на которые вырабатываются антитела при менингококковой инфекции, была изучена способность пептидов связываться с иммуноглобулинами сывороток крови мышей CBA/La, выживших после заражения сублетальной дозой менингококка серогруппы В (штамм 44/76). Результаты, приведенные в табл. 2, показывают, что из изученных пептидов лишь два (пептиды (VIII) и (XIII)) связываются сывороткой инфицированных мышей. Участок 178–199 (пептид (VIII)) соответствует части 4-й петли (см. рис. 1), против которой, как известно, вырабатываются бактерицидные антитела [5]. Антигенные свойства участка 311–328 (пептид (XIII)), соответствующего высококонсервативной 7-й петле, ранее не были описаны. Оказалось, что динамика выработки антител против этих двух участков различна (см. табл. 2).

Некоторые из синтезированных пептидов ((II), (VI), (VIII), (X)) были изучены в опытах активной защиты мышей от заражения летальной дозой живой вирулентной культуры *N. meningitidis* серогруппы В (штамм 44/76). Мышей CBA/La дважды иммунизировали пептидами и через 2 мес. после реиммунизации заражали менингококком (табл. 3). В качестве контроля использовали интактных животных, а также мышей, иммунизированных полным адъювантом Фрейнда (группа А). Для заражения животных использовали две дозы культуры бактерии, содержащие 10^6 и 10^7 микробных клеток. Поскольку адъювант вызывал неспецифическую защиту животных, протективную активность пептидов оценивали сравнением с результатами, полученными в группе А мышей.

Как показали испытания, при низкой дозе заражения наиболее высокую активность проявили пептиды (II) и (VIII): в обоих случаях выжили шесть животных, в то время как в группе А только четыре. Пептид (VI) не был активным, а пептид (X) проявил промежуточную активность (выжили пять мышей). При более высокой дозе заражения наиболее активными были пептиды (VIII) и (X): отличие от группы А в этих случаях заключалось в двух особях. Пептид (II) показал промежуточные результаты (отличие от группы А составило одно животное), а пептид (VI), так же как и при более низкой дозе заражения, не был активен.

Таким образом, наиболее высокую протективную активность проявил пептид (VIII), соответ-

вующий участку 178–199 4-й петли белка, против которой направлены бактерицидные антитела. Пептид (VIII) индуцировал гуморальный ответ у мышей СВА/La и связывался с противоменингитными антителами (см. табл. 1, 2). Наиболее вероятно, что защитное действие этого пептида обусловлено его способностью индуцировать антибактериальные антитела. Пептиды (II) и (X) проявили более низкую активность, чем пептид (VIII). Эти пептиды не связывались с противоменингитной сывороткой, а гуморальный ответ у мышей вызывал только пептид (II). Пептид (VI), несмотря на то, что он является участком 4-й петли и частично перекрывается с активным пептидом (VIII), не проявил активности ни в одном тесте (отсутствие протективности, иммуногенности и связывания с антибактериальными антителами).

Более подробное и детальное изучение протективной активности синтезированных пептидов, а также механизма протективного эффекта является предметом дальнейших исследований.

Таким образом, проведенное исследование показало, что синтетические пептиды – аналоги фрагментов белка P_{ogA} из *N. meningitidis* штамма В:15:P1.7,16 в свободном виде, без конъюгации с белком-носителем проявляют иммуногенные свойства, а некоторые из них обладают протективной активностью. Полученные результаты демонстрируют перспективность дальнейшего исследования свойств синтетических пептидов – аналогов фрагментов белка P_{ogA} и других белков наружной мембраны для разработки на их основе препаратов – потенциальных компонентов вакцины против менингококка серогруппы В.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы для пептидного синтеза и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), *n*-алкоксибензильный полимер (Merck, ФРГ). Для обессоливания применяли сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция). Для ВЭЖХ использовали хроматограф System Gold (Beckman, США), колонки Beckman ODS, 5 мкм (4,6 × 250 мм) – для аналитической и ALTEX ULTRASPHERE-OCTYL, 5 мкм (10 × 250 мм) – для препаративной хроматографии. Гидролиз пептидов проводили смесью б.н. HCl–TFA (2 : 1) в течение 45 мин при 170°C. Растворители очищали согласно известным методикам [17].

Масс-спектрометрию осуществляли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ); все синтезированные пептиды имели корректный аминокислотный состав.

В иммунохимических исследованиях применяли полный и неполный адъюванты Фрейнда, же-

Таблица 3. Протективная активность синтетических пептидов – фрагментов белка P_{ogA}

Иммуноген	Число выживших мышей*	
	доза менингококка (число микробных клеток)	
	10 ⁶	10 ⁷
22–41 (II)	6/10	3/10
166–187 (VI)	4/10	1/10
178–199 (VIII)	6/10	4/10
233–252 (X)	5/10	4/10
Группа А	4/10	2/10
Контроль	2/10	0/10

* Отношение числа выживших животных к общему числу животных в эксперименте (суммарные результаты двух экспериментов).

лезный декстран (Sigma, США), глутаровый диальдегид, овальбумин (POCH, Польша), антитела козы против иммуноглобулинов мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), 96-луночные платы из полистирола (Nunc Maxisorb, Дания). Для иммунизации использовали самок мышей линий Balb/c, C₅₇/B1, СВА/La весом 18–20 г.

Твердофазный синтез пептидов проводили на *n*-алкоксибензильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.37 ммоль/г. Полимер промывали DMF, эфиром и высушивали. В 15 мл DMF суспендировали 300 мг *n*-алкоксибензильного полимера, добавляли 150 мг НОВТ (10 экв.), 24 мг DMAP (0.2 ммоль) и 10 экв. стартовой Fmoc-защищенной аминокислоты. К суспензии приливали 172 мкл DIPIC (10 экв.) и перемешивали в течение 4 ч при 0°C. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали DMF, CH₂Cl₂ и обрабатывали 5 мл смеси Ac₂O–пиридин–CH₂Cl₂ (20 : 20 : 60) в течение 1 ч, после чего полимер промывали CH₂Cl₂, изопропанолом и снова CH₂Cl₂. Нарастивание пептидной цепи вели в проточном реакторе по следующему протоколу для каждого синтетического цикла (из расчета 8–10 мл растворителя на 300 мг исходного полимера), при проведении реакций конденсации (операции 9 и 11) использовали объем реакционной смеси 3 – 4 мл: 1) CH₂Cl₂ (2 × 2 мин); 2) DMF (2 × 2 мин); 3) 55% пиперидин в DMF (20 мин); 4) DMF (2 × 2 мин); 5) диоксан–вода, 2 : 1 (2 × 5 мин); 6) DMF (3 × 2 мин); 7) CH₂Cl₂ (3 × 2 мин); 8) DMF (2 × 2 мин); 9) первая конденсация: 2 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (1 ч); 10) DMF (2 × 2 мин); 11) повторная конденсация: 2 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (1 ч); 12) DMF (2 × 2 мин); 13) CH₂Cl₂ (2 × 2 мин); 14) ацилирование: Ac₂O–пиридин–CH₂Cl₂, 20 : 20 : 60 (30 мин);

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^+)
12–31 (I)	13.4	1977.09	1978
22–41 (II)	10.6	1917.12	1918
32–51 (III)	11.0	2228.73	2230
77–96 (IV)	18.3	2095.19	2097
118–143 (V)	22.2	2900.09	2902
166–187 (VI)	17.3	2503.73	2505
178–187 (VII)	12.3	1245.32	1246
178–199 (VIII)	22.6	2351.66	2352
223–242 (IX)	27.3	2160.40	2162
233–252 (X)	24.0	2090.34	2091
273–292 (XI)	14.9	2135.29	2136
306–321 (XII)	17.3	1791.06	1792
311–328 (XIII)	14.4	2091.24	2093
346–363 (XIV)	16.8	1993.23	1994

15) изопропанол (3 × 2 мин); 16) CH₂Cl₂ (3 × 2 мин); 17) DMF (3 × 2 мин).

Для преактивации аминокислот к раствору 2 экв. Fmoc-защитенной аминокислоты и 2 экв. TBVTU в 3–4 мл DMF добавляли 2 экв. DIEA, раствор перемешивали 10 мин. Контроль за содержанием непрореагировавших аминогрупп проводили с помощью нингидринового или, в случае *N*-концевого пролина, пикринового тестов после операции 13 синтетического протокола [18, 19]. При положительном тесте цикл конденсации (операции 10–13) повторяли.

Отщепление пептида от полимера с одновременным деблокированием проводили, используя аликвоту пептидполимера 300 мг в 5 мл смеси TFA–этандитиол–DMS–*m*-крезол в объемном соотношении 91 : 3 : 3 : 3 в течение 2 ч. Смесь отфильтровывали от полимера. Раствор упаривали при пониженном давлении, затем добавляли 100 мл этилового эфира, продукт отщепления отфильтровывали и промывали эфиром (5 × 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 × 60 см) с сефадексом G-10 в 0.1 М AcOH. Очистку пептида проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте 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, масс-спектрометрии (табл. 4) и аминокислотного анализа. Аналитическую ВЭЖХ проводили в условиях, аналогичных препаративной, при скорости потока элюента 1 мл/мин.

Получение конъюгатов пептидов с овальбунином. 3 мг пептида и 3 мг овальбумина растворяли в 1 мл PBS и при перемешивании в течение 1 ч добавляли 100 мкл 0.5% водного глутарового диальдегида. Полученный раствор перемешивали 15 ч, после чего диализовали против PBS с двукратной сменой буфера.

Твердофазный иммуноферментный анализ. В лунки плашки вносили по 0.1 мл раствора либо пептида в 0.05 М Na-карбонатном буфере (pH 9.6) в концентрации 20 мкг/мл, либо конъюгата пептида с овальбунином в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали 16 ч при 4°C. Раствор пептида удаляли и плашку четырежды отмывали PBS, содержащим 0.05% Твин-20. Подобные промывки проводили после каждой последующей стадии инкубации. В лунки вносили по 0.1 мл образцов сывороток в двойных разведениях, начиная с разведения 1 : 10 или 1 : 100, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Далее проводили инкубацию (1 ч, 37°C) с конъюгированными с пероксидазой хрена антителами козы против иммуноглобулинов мышей (0.1 мл, 1 мг/мл в PBS), а затем с раствором субстрата (0.1 мл): 0.05% перекись водорода и 0.05% *o*-фенилендиамин в 0.05 М Na-цитратном буфере, pH 4.5. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 12.5% H₂SO₄. Оптическое поглощение при длине волны 492 нм измеряли на приборе Multiscan Plus MKII (Flow Laboratories, Великобритания). За титр противопептидных антител принимали значение разведения сыворотки, дающее поглощение более 0.1 ОЕ и превышающее фоновый уровень в два раза.

Иммунизация животных. Раствор пептида в PBS (концентрация 2 мг/мл) смешивали с равным объемом полного – для первой иммунизации или неполного – для второй иммунизации адъюванта Фрейнда до получения эмульсии.

Мышей иммунизировали дважды с интервалом в 45 сут. Пептиды вводили по 100 мкг (0.1 мл эмульсии) подкожно в основание хвоста. Кровь забирали через 10 сут после реиммунизации из ретроорбитального синуса или тотально. Полученные сыворотки хранили при –20°C.

Для получения антибактериальной противоменингитной сыворотки мышей линии СВА/La заражали сублетальной дозой (10⁴ микробных клеток) вирулентной культуры менингококка (штамм 44/76). Культура была получена как описано в [20], оптимизирована, лиофильно высушена и любезно предоставлена для работы И.А. Баснакъян (Центральный научно-исследователь-

ский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова).

Изучение протективного эффекта пептидов в опытах активной защиты мышей от заражения живой культурой менингококка. Оценку протективной активности проводили на мышах СВА/Ла весом 16–18 г. Группу из 5 мышей дважды иммунизировали пептидами по приведенной выше схеме. Через 2 мес. после реиммунизации животных заражали внутрибрюшинно в объеме 0.5 мл живой вирулентной культурой менингококка серогруппы В (штамм 44/76) в дозе 10^6 или 10^7 микробных клеток в растворе железного декстрана в разведении 1 : 1 [21]. Результаты опыта учитывали в течение 7 дней. Контролем служили группы интактных мышей и мышей, получивших инъекции полного и неполного адъюванта Фрейнда по аналогичной схеме. В табл. 3 для каждой дозы менингококка приведены суммарные результаты двух независимых экспериментов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frasci C.E. // Clin. Microbiol. Rev. 1989. V. 2. P. S134–S138.
2. Gotschlich E.C., Goldschneider J., Artenstein S. // J. Exp. Med. 1969. V. 129. P. 1367–1384.
3. Finne S., Bitter-Suerman D., Goridis C., Finne U. // J. Immunol. 1987. V. 138. P. 4402–4407.
4. Zollinger W.D., Moran E., Trans R. // Soc. Trop. Med. Hyg. 1991. V. 85. P. 37–43.
5. Poolman J.T. // Inf. Agents Dis. 1995. V. 4. P. 13–28.
6. Tomassen J., Vermeij P., Struyve M. // Infect. Immun. 1990. V. 58. P. 1355–1359.
7. Saukkonen K., Leinonen M., Abdillahi H. // Vaccine. 1989. V. 7. P. 325–328.
8. Van der Ley P., Heckels J.E., Virji J.E. // Infect. Immun. 1991. V. 59. P. 2963–2971.
9. Wiertz E.J.H.J., van Gaans-van den Brink J.A.M., Schreuder G.M.T.H. // J. Immunol. 1991. V. 147. P. 2012–2018.
10. McGuinness B., Barlow A.K., Clarke I.N. // J. Exp. Med. 1990. V. 171. P. 1871–1882.
11. Дельвиг А.А., Семенов Б.Ф. // Журн. микробиол. 1997. № 6. С. 92–96.
12. Christodoulides M., McGuinness B.T., Heckels J.E. // J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. P. 1729–1738.
13. Christodoulides M., Heckels J.E. // Microbiol. 1994. V. 140. P. 2951–2960.
14. Hoogerhout P., Donders E.M., van Gaans-van Brink J.A. // Infect. Immun. 1995. V. 63. P. 3473–3478.
15. Rammensee H.-G., Friede T., Stevanović S. // Immunogenetics. 1995. V. 41. P. 178–228.
16. Udenfriend S., Meienhofer J. The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology. London: Acad. Press, 1987. V. 9. P. 27–30.
17. Perrin D.D. Purification of Laboratory Chemicals. N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1–563.
18. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. P. 147–157.
19. Gisin B.F. // Anal. Chim. Acta. 1972. V. 58. P. 248–249.
20. Calver G.A., Kenny C.P., Laverne G. // Can. J. Microbiol. 1976. V. 22. P. 832–838.
21. Агафонова С.А., Аллилуев А.П., Котельникова О.В. // Иммунология. 1997. № 1. С. 39–41.

Induction of Antimeningitis Immunity by the Synthetic Peptides.

I. The Immunoactive Synthetic Fragments of Porin A from *Neisseria meningitidis*

D. O. Koroev[#], O. V. Kotelnikova*, O. M. Volpina*, M. N. Zhmak*, M. A. Kupriyanova*, S. A. Agafonova*, A. P. Alliluev^{**}, I. S. Litvinov*, V. A. Nesmeyanov*, and V. T. Ivanov*

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

**Institute of General and Clinical Pathology, Peoples Friendship University of Russia, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198 Russia

Fourteen peptides corresponding to sequences of all the exposed and some of the transmembrane protein regions of porin A from the outer membrane of *Neisseria meningitidis* strain B:15:P1.7,16 were synthesized. Mice of various lines were immunized with the free peptides not conjugated with any protein carrier. It was shown that the majority of the peptides possess immunogenic properties. Two peptides were identified binding to antibodies present in the serum of mice after meningitis. Protective properties of a number of the synthesized peptides were studied, and three peptide sequences inducing mice protection from an experimental infection with *N. meningitidis* were identified.

Key words: *Neisseria meningitidis*; porin A; synthetic peptides, immunogenicity, protective activity

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: fmdv@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 5. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.