



УДК 577.112.6.083.3:615.371

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

© 2001 г. Д. О. Короев<sup>#</sup>, О. М. Вольпина, М. Н. Жмак, М. А. Куприянова,  
В. А. Несмеянов, А. П. Аллилуев\*, О. В. Котельникова, 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 28.06.2000 г. Принята к печати 11.09.2000 г.

Проведена иммунизация мышей различных линий 11 синтезированными фрагментами белка OpaB внешней мембраны *Neisseria meningitidis*. Эти фрагменты включали в себя описанные в литературе последовательности Т-хелперных эпитопов людей и всех потенциальных Т-хелперных эпитопов мышей, которые были обнаружены в данном белке. Иммунизация пептидами проведена без их конъюгации с белком-носителем. В ходе эксперимента установлено, что большинство пептидов индуцирует у мышей образование противопептидных антител. В опыте по защите животных от экспериментального заражения вирулентным штаммом *N. meningitidis* группы В выявлены два фрагмента, имеющие наиболее выраженные защитные свойства по сравнению с остальными пептидами.

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

### ВВЕДЕНИЕ

Патогенный микроорганизм *Neisseria meningitidis* серогруппы В вызывает заболевание менингококковым менингитом В, против которого в настоящее время не существует эффективной и безопасной вакцины. Один из новых и перспективных путей защиты от бактериальных инфекций заключается в создании синтетических антибактериальных вакцин нового поколения. Данная работа – продолжение исследований по созданию искусственной вакцины против менингококковой инфекции серогруппы В на основе синтетических фрагментов белков внешней мембраны [1].

Среди белков внешней мембраны менингококка белки 5 класса являются уникальными компонентами, ответственными за адгезию на эпителиальных тканях организма хозяина и последующую инвазию в них [2]. Известно, что большинство антител у вакцинированных против менингита В людей направлено именно к белкам 5 класса. Кроме

того, белки этого класса индуцируют высокую Т-хелперную активность [3]. В ряду белков 5 класса особый интерес представляют белки Opa, три или четыре варианта которых содержатся в каждом штамме менингококка. Показано, что Opa-белки обладают наибольшей активностью при стимуляции *in vitro* Т-хелперных клеток крови вакцинированных людей. Эти свойства делают Opa-белки перспективными соединениями для разработки на их основе противоменингитных вакцин. Ограничением при использовании Opa-белков является их высокая вариабельность среди менингококков различных серогрупп, штаммов и внутри каждого штамма. Однако гипервариабельные последовательности локализованы в двух участках и не превышают 35 а.о., поэтому использование для вакцинации синтетических фрагментов константных районов белка, имеющих высокую степень гомологии для белков различных серогрупп и штаммов менингококка, может обеспечить стимуляцию противоменингитного иммунитета широкого спектра [2].

Настоящая работа посвящена изучению иммуногенных и протективных свойств синтетических фрагментов белка OpaB внешней мембраны *N. meningitidis*. При выборе пептидов была использована первичная структура белка OpaB менингококка серогруппы А [3], антигенные и иммуногенные свойства которого наиболее подробно изучены в ряду Opa-белков различных менингококковых серогрупп. Наличие высококонсервативных рай-

Сообщение 1 см. [1].

Сокращения: DIPC – *N,N'*-диизопропилкарбодиимид; DIEA – *N*-диизопропилэтиламин; DMAР – 4-диметиламинопирдин; DMS – диметилсульфид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; НОВТ – 1-гидроксибензотриазол; МНС – главный комплекс гистосовместимости; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; PBS – 0.01 М раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 7.4); МС – масс-спектрометрия.

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

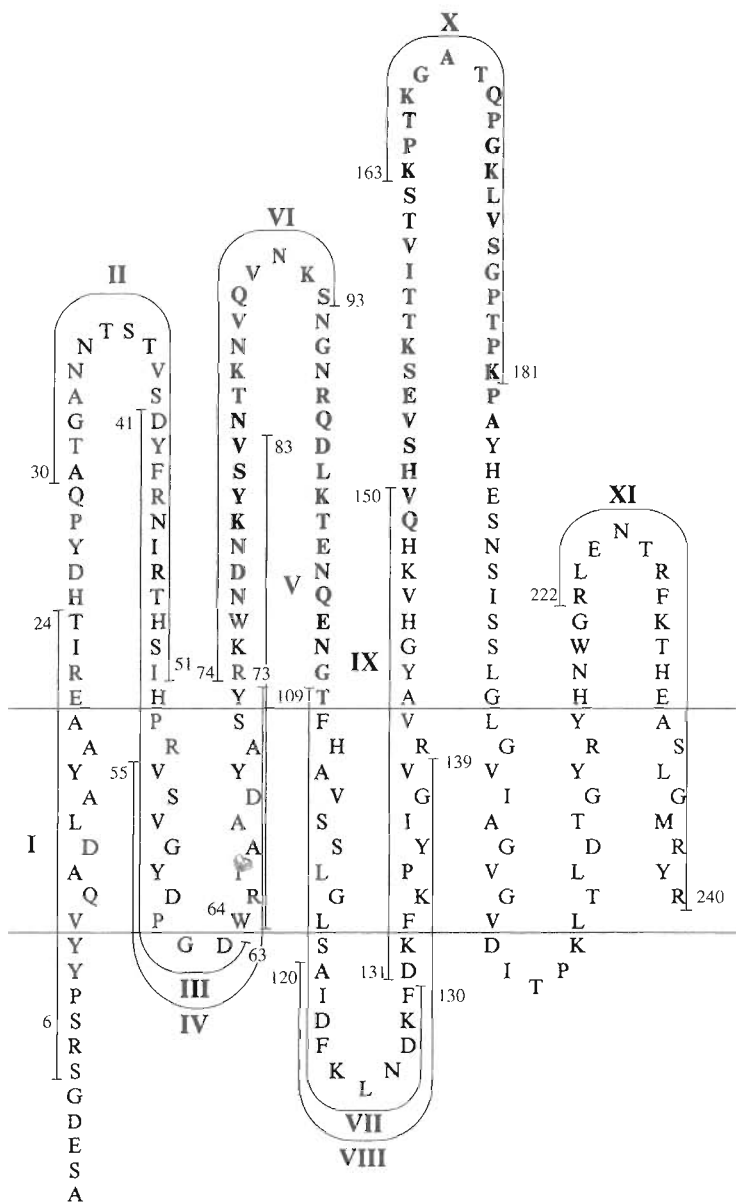


Рис. 1. Двумерная топографическая модель белка ОраВ *N. meningitidis*.

Выделены и пронумерованы синтезированные последовательности; жирным шрифтом обозначены гипервариабельные области HV1 и HV2.

онов в аминокислотной последовательности этого белка позволяет рассчитывать на проявление его фрагментами специфической активности против менингококка серогруппы В.

Белок ОраВ содержит 240 а.о. Согласно гипотетической модели расположения белка во внешней мембране менингококка, на ее поверхности экспонированы 4 гидрофильные петли, а мембрану пронизывают 8 трансмембранных участков [2] (рис. 1). Гипервариабельные районы белка локализованы во 2-й и 3-й петлях белка в участках 77–108 и 149–183. Изучение синтетических пептидов в тесте стимуляции *in vitro* Т-клеток крови вакцинированных людей показало, что основные Т-хелпер-

ные эпитопы локализованы в участках 7–25, 32–94, 116–147 и 225–240 белка ОраВ (петли, трансмембранные районы) [3]. Проведенный нами расчет потенциальных Т-хелперных эпитопов показал, что участки 39–76 и 121–147 (петли) содержат мотивы для связывания на мышиных антигенах главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса локуса I-E [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор фрагментов белка ОраВ был осуществлен таким образом, чтобы синтезированные пептиды (I)–(XI) покрывали последовательность всех

описанных в литературе Т-хелперных эпитопов людей (пептиды (I)–(V), (VII)–(XI)) [3] и теоретически рассчитанных потенциальных Т-хелперных эпитопов мышей (пептиды (II)–(V), (VII)–(IX)) [4]. Мы в первую очередь выбирали участки, которые содержали Т-эпитопы и обладали высокой иммуногенной активностью, при этом не ставили задачу полного охвата последовательности экспонированных петель синтетическими пептидами (см. рис. 1). Аминокислотная последовательность синтетических фрагментов белка ОраВ приведена на рис. 2. Последовательность синтетических пептидов покрывает большую часть экспонированных на поверхности внешней мембраны петель и полностью покрывает 6 из 8 трансмембранных участков. Все выбранные для синтеза пептиды соответствуют константным районам белка, кроме двух пептидов (VI) (74–93) и (X) (163–181) из гипервариабельных участков.

Пептиды (I)–(XI) получены твердофазным методом путем наращивания цепи с С-конца в ручном варианте на *n*-алкоксибензильном полимере [5]. Защитные группы боковых функциональных групп аминокислотных остатков выбраны с расчетом на конечное деблокирование трифторуксусной кислотой. Для защиты боковых функций Thr, Tyr, Ser использовали Bu<sup>t</sup>-группу, для Asp, Glu – OBu<sup>t</sup>-группу, для Lys – Boc-, для Arg – Pbf-, для His – Tgt-группы. В качестве временной N<sup>α</sup>-защитной группы служила Fmoc-группировка.

Для наращивания полипептидной цепи на полимере применяли НОВТ-DIPС-метод. Реакцию конденсации осуществляли дважды. После второй конденсации проводили анализ на непрореагировавшие аминогруппы. При неудовлетворительном результате реакцию конденсации повторяли до степени превращения более 99%. Каждый цикл синтеза заканчивали ацилированием оставшихся непрореагировавших аминогрупп с помощью ук-сусного 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 с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Пептиды синтезировали, исходя из 300 мг *n*-алкоксибензильного полимера, после окончания синтеза масса пептидил-полимера возрастала в 2–3 раза; деблокирование проводили на аликвоте пептидилполимера 300 мг. Выход пептидов составил 40–130 мг (60–80% в расчете на содержание гидроксильных групп исходного *n*-алкоксибензильного полимера).

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

Способность синтетических пептидов стимулировать образование антител была изучена на мышах

6	24	
SRSPYYVQADLAYAAERIT		(I)
30	51	
ATGANNSTVSDYFRNIRTHSI		(II)
41	63	
DYFRNYRTHSIHPRVSVGYDPGD		(III)
55	73	
VSVGYDPGDWRIAADYASY		(IV)
64	83	
WRIAADYASYRKWNDNKYSV		(V)
74	93	
RKWNDNKYSVNTKNVQVNKS		(VI)
109	130	
TFHAVSSLGLSAIYDFKLNDFK		(VII)
120	139	
AIYDFKLNDFKFDKFKPYIGV		(VIII)
131	150	
DKFDKFKPYIGVRVA YGHVKNQV		(IX)
163	181	
KPTKGATQPGKLVSGPTPK		(X)
222	240	
RLENTRFKTHEASLGMR YR		(XI)

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

линий Balb/c (H-2d), C<sub>57</sub>/Bl (H-2b) и CBA/La (H-2k), различающихся типом локуса H-2 основного комплекса гистосовместимости. Мышей иммунизировали дважды свободными пептидами без конъюгации с белком-носителем. Полученные сыворотки исследовали методом ИФА на связывание со свободными пептидами, сорбированными на планшете.

Результаты испытаний показали (табл. 1), что все 11 синтезированных пептидов в свободном виде индуцировали гуморальный иммунный ответ, то есть эти пептиды содержали эпитопы, активирующие Т-хелперные клетки. Пептид 163–181 (X) проявил иммуногенные свойства только на одной линии мышей CBA/La, а пептиды 30–51 (II) и 74–93 (VI) проявили активность на двух линиях животных Balb/c и C<sub>57</sub>/Bl. Остальные изученные пептиды были способны стимулировать образование антител на всех трех линиях мышей. Полученные результаты хорошо согласуются с произведенными расчетами по предсказанию Т-хелперных эпитопов мышей [4]: все пептиды, за исключением фрагментов (I), (VI), (X) и (XI), со-

**Таблица 1.** Способность синтетических фрагментов белка ОраВ индуцировать противопептидный гуморальный ответ

Иммуноген	Фрагмент белка	Титр противопептидных антител, Ig		
		Balb/c	C <sub>57</sub> /Bl	СВА
(I)	6–24	3.2	4.2	4.5
(II)	30–51	3.2	4.1	<1.0
(III)	41–63	4.2	3.8	4.8
(IV)	55–73	4.2	1.0	3.5
(V)	64–83	2.5	3.8	4.8
(VI)	74–93	3.8	2.5	<1.0
(VII)	109–130	4.8	4.8	4.5
(VIII)	120–139	3.1	2.2	1.9
(IX)	131–150	4.1	4.1	4.2
(X)	163–181	<1.0	<1.0	3.1
(XI)	222–240	3.8	4.1	4.1

**Таблица 2.** Протективная активность синтетических фрагментов белка ОраВ на мышцах линии СВА/La

Иммуноген	Число защищенных мышей*, доза менингококка (число микробных тел)			Суммарная защита
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	
(I)	8/10	4/10	0/10	12/30
(V)	10/10	7/10	2/10	19/30
(VII)	9/10	8/10	2/10	19/30
(VIII)	8/10	4/10	1/10	13/30
(IX)	9/10	6/10	1/10	16/30
(X)	5/10	2/10	0/10	7/30
(XI)	6/10	0/10	0/10	6/30
Адьювант	5/10	3/10	0/10	8/30

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

держат предсказанные эпитопы, и среди них именно пептиды (VI) и (XI) проявили более низкую, чем остальные фрагменты активность.

Способность синтетических пептидов 6–24 (I), 64–83 (V), 109–130 (VII), 120–139 (VIII), 131–150 (IX), 163–181 (X) и 222–240 (XI) индуцировать протективный иммунитет была изучена в опытах активной защиты мышей. Мышей линии СВА/La дважды иммунизировали пептидами и через 2 мес. после второй иммунизации заражали менингококком (табл. 2). В качестве контроля использовали мышей, получивших адьювант без добавления пептидов. Для заражения животных использовали три дозы культуры бактерии – 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> и 10<sup>8</sup> микробных клеток. Протективную активность пептидов оценивали, сравнивая с результатами, полученными в группе мышей, получивших только инъекцию адьюванта.

Как показали испытания, при низкой дозе заражения наибольшую активность проявили пеп-

тиды 64–83 (V), 109–130 (VII) и 131–150 (IX), обеспечившие защиту 9–10 животных из 10, в то время как в адьювантной группе только 5 животных из 10 не погибли. Пептиды 163–181 (X) и 222–240 (XI) не были активными, а пептиды 6–24 (I) и 120–139 (VIII) проявили промежуточную активность (выжили 8 мышей). При дозе заражения 10<sup>7</sup> микробных клеток сохранились те же закономерности в проявлении протективного эффекта, а при дозе заражения 10<sup>8</sup> микробных клеток наиболее активными были пептиды 64–83 (V) и 109–130 (VII). Сравнение суммарных данных по защите каждым из пептидов при заражении тремя дозами менингококка подтверждает полученные результаты: наиболее активными являются пептиды 64–83 (V) и 109–130 (VII), несколько менее активен пептид 131–150 (IX), промежуточную активность проявили пептиды 6–24 (I) и 120–139 (VIII), фрагменты 163–181 (X) и 222–240 (XI) C-концевой части молекулы белка не активны.

Таким образом, наиболее активны и перспективны в плане создания на их основе синтетической противоменингитной вакцины пептиды 64–83 (V) и 109–130 (VII). Эти фрагменты иммуногенны на лабораторных животных, содержат расчетные T-хелперные эпитопы людей и являются константными в ряду различных серогрупп менингококка, что позволяет надеяться на проявление ими активности против возбудителей менингококковой инфекции различной серогрупповой и серосубтиповой принадлежности.

Поскольку все изученные в тесте на протективную активность пептиды были высокоиммуногенны, то, по-видимому, различия в их протективной активности связаны с разной антимикробной активностью индуцируемых пептидами антител. Изучение протективной активности всех синтезированных пептидов, а также механизмов индукции протективного противоменингитного иммунитета с помощью синтетических пептидов служат предметом дальнейших исследований.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы для пептидного синтеза и производные аминокислот (Merck, ФРГ; Fluka, Швейцария), алкоксибензиловый полимер (Merck, ФРГ). Для обессоливания применяли сефадекс G-10 (Pharmacia, Швеция). Для ВЭЖХ использовали хроматограф System Gold (Beckman, США), колонки Beckman ODS (4.6 × 250 мм, 5 мкм) для аналитической хроматографии и ALTEX ULTRASPHERE-OSTYL (10 × 250 мм, 5 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 [6]. Масс-спектрометрию выполняли методом MALDI на приборе VISION 2000 (Bioanalysis, Великобритания). Аминокислотный анализ проводили на приборе Biotronik LC-3000 (ФРГ).

В иммунохимических исследованиях применяли полный и неполный адъюванты Фрейнда (Sigma, США), козьи антитела 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, C<sub>57</sub>/Bl, CBA весом 18–20 г. Для заражения применяли менингококк штамма В : 15 : P1.7,16, выращенный в Институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

**Синтез пептидов.** Твердофазный синтез пептидов проводили на *n*-алкоксibenзильном полимере с содержанием гидроксильных групп 0.37 ммоль/г. Полимер промывали DMF, эфиром и высушивали. 200 мг *n*-алкоксibenзильного полимера 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 *n*-алкоксibenзильного 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 в проточном реакторе по следующему протоколу для каждого синтетического цикла (при расходе 5–7 мл растворителя на 200 мг исходного *n*-алкоксibenзильного полимера): 1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 2 мин); 2) DMF (2 × 2 мин); 3) 20% пиперидин в DMF (20 мин); 4) DMF (2 × 2 мин); 5) диоксан–вода, 2 : 1 (2 × 5 мин); 6) DMF (3 × 2 мин); 7) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 2 мин); 8) DMF (2 × 2 мин); 9) 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 10) DMF (2 × 2 мин); 11) 3 экв. активированной Fmoc-аминокислоты (2 ч); 12) DMF (2 × 2 мин); 13) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 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 × 2 мин); 16) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 2 мин); 17) DMF (3 × 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 операций 13 синтетического протокола [7, 8]. При положительном нингидриновом или, в случае *N*-концевого Pro, пикриновом теста цикл конденсации (операции 10–13) повторяли.

Отщепление пептида от полимера с одновременным деблокированием проводили на 200 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 по-

**Таблица 3.** Времена удерживания пептидов в условиях аналитической ВЭЖХ, молекулярные массы пептидов и данные масс-спектрометрии (МС)

Пептид	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	
		вычисленная	по данным МС (M <sup>+</sup> )
(I)	25.0	2173.1	2173.9
(II)	21.3	2324.5	2324.5
(III)	23.7	2700.3	2700.6
(IV)	30.2	2105.3	2106.0
(V)	24.0	2506.8	2507.1
(VI)	16.5	2422.7	2423.5
(VII)	26.3	2475.0	2475.6
(VIII)	22.6	2421.8	2422.3
(IX)	20.0	2730.5	2731.7
(X)	19.3	1892.3	1893.1
(XI)	19.5	2365.7	2366.2

ниженном давлении. Пептид осаждали 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. 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. 3. Все пептиды имели корректный аминокислотный состав.

**Иммунизация животных.** Для иммунизации животных готовили растворы пептидов в 0.01 М Na-фосфатном буфере pH 7.4 (PBS) в концентрации 2 мг/мл, раствор пептида смешивали с равным объемом полного – для первой иммунизации и неполного – для второй иммунизации адъюванта Фрейнда до получения эмульсии.

Мышей весом 16–18 г (по 7 в каждой группе для изучения иммуногенной активности и по 10 в каждой группе для изучения протективной активности) иммунизировали дважды с интервалом в 40 сут. Мышам вводили по 100 мкг (0.1 мл) суспензии пептида подкожно в основание хвоста. Для изучения титров антител кровь отбирали на 55 сут после первой иммунизации из ретроорбитального синуса или тотально и готовили сыворотки. Сыворотки хранили при температуре –20°C.



**Твердофазный иммуноферментный анализ.** В лунки плашки вносили по 0.1 мл раствора пептида в 0.05 М Na-карбонатном буфере (pH 9.6) в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 16 ч при 4°C. Раствор пептида сливали, лунки четырежды отмывали PBS, содержащим 0.05% Твина-20 (PBST). Затем в лунки вносили по 0.1 мл образцов сывороток в двойных разведениях, начиная с разведения 1 : 10 или 1 : 100. После инкубации плашки в течение 1 ч при 37°C растворы сывороток сливали, плашки четырежды отмывали PBST и вносили в лунки по 0.1 мл раствора конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител против иммуноглобулинов мышей в разведении 1 мг/мл. Плашку инкубировали 1 ч при 37°C, отмывали, как описано выше, и вносили в лунки по 0.1 мл субстрата (0.05% *o*-фенилендиамина, 0.05% концентрированной перекиси водорода) в 0.05 М Na-цитратном буфере, pH 4.5. Развитие окраски останавливали добавлением 12.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическое поглощение при длине волны 492 нм измеряли на приборе Multiscan Plus MK11 (Flow laboratories, Великобритания). За титр противопептидных антител принимали значение соответствующего разведения сыворотки, дающее окрашивание более 0.1 ОЕ (λ 492 нм) и превышающее фоновый уровень в два раза.

**Изучение протективного эффекта.** Изучение протективной активности проводили на трех группах мышей СВА/La по 10 животных в группе. Мышей в каждой группе 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<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> или 10<sup>8</sup> микробных клеток в растворе железного декстрана (Sigma, США) в разведении 1 : 1 [9]. Контролем служили группы мышей, получивших инъекции полного и неполного адъюванта Фрейнда по аналогичной схеме. Защищенными считались животные, не погибшие в течение недели после заражения. В табл. 2 приведены результаты для каждой дозы менингококка и суммарные результаты трех экспериментов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26, С. 323–329.
2. Malorny B., Morelli G., Kusecek B., Kolberg J., Achtman M. // J. Bacteriology. 1998. V. 180. P. 1323–1330.
3. Wiertz E.J.H.J., Delvig A., Donders E.M.L.M., Brughe H.F., Unen L.M.A., Timmermans H.A.M., Achtman M., Hoogerhout P., Poolman J.T. // Infection and Immunity. 1996. V. 64. P. 298–304.
4. Rammensee H.-G., Friede T., Stevanovic S. // Immunogenetics. 1995. V. 41. P. 178–228.
5. Udenfriend S., Meienhofer J. The Peptides. London. Academic Press. Inc., 1987. V. 9. P. 27–30.
6. Perrin D.D. Purification of Laboratory Chemicals. N.Y.: Pergamon Press, 1980. P. 563.
7. Sarin V.K., Kent S.B.H., Tam J.P., Merrifield R.B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. P. 147–157.
8. Gisin B.F. // Anal. Chim. Acta. 1972. V. 58. P. 248–249.
9. Агафонова С.А., Аллилуев А.П., Котельникова О.В. // Иммунология. 1997. № 1. С. 39–41.

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

D. O. Koroev<sup>#</sup>, O. M. Volpina\*, M. N. Zhmak\*, M. A. Kupriyanova\*, V. A. Nesmeyanov\*, A. P. Alliluev\*\*, O. V. Kotelnikova\*, 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

Mice of various lines were immunized by 11 synthetic peptides that correspond to the sequences of fragments of the OpaB protein from the outer membrane of *Neisseria meningitidis* involving the known human T-helper epitopes and all the potential mouse T-helper epitopes calculated for the protein. The mice were immunized with the free peptides without their conjugation with a protein carrier. Most of the peptides were found to induce in mice the production of antipeptide antibodies. The mice protection against the experimental infection by a virulent strain of *N. meningitidis* of the B serotype was studied, and two peptides were shown to exert the most pronounced protective effect.

*Key words:* *Neisseria meningitidis*, OpaB, synthetic peptides, immunogenicity, protective effect

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-5777; e-mail: koroev@mail.ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.