



УДК 577.112.083.3 : 615.371

АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ВИРУСА ЯЩУРА  
III \*. ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИММУНОДОМИНАНТНОГО РАЙОНА  
БЕЛКОВ VP<sub>1</sub> ШТАММОВ O<sub>1</sub>K И A<sub>22</sub> ВИРУСА ЯЩУРА

*Суровой А. Ю., Гельфанов В. М., Вольпина О. М.,  
Иванов В. Т., Чепуркин А. В.\*, Иванющенко В. Н.\*,  
Дрягалин Н. Н.\*, Бурдов А. Н.\**

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук  
СССР, Москва;*

*\* Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт, г. Владимир*

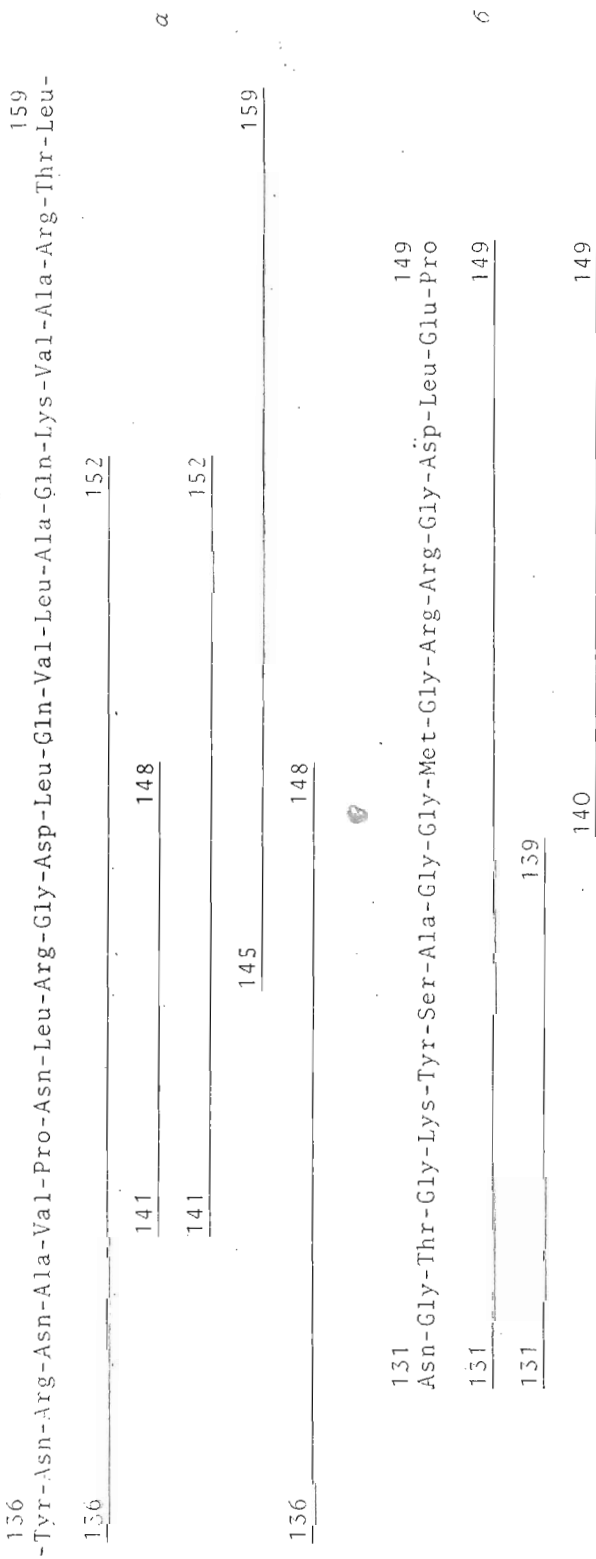
Изучены иммуногенные и протективные свойства свободных и КЛН-конъюгированных пептидов с последовательностью иммунодоминантного района белков VP<sub>1</sub> штаммов O<sub>1</sub>K и A<sub>22</sub> вируса ящура. Пептиды 136—148, 136—152 (O<sub>1</sub>K), 131—149 и 140—149 (A<sub>22</sub>) проявляют иммуногенные свойства без конъюгации с носителем на морских свинках, вызывая 50—100% защиту от заражения гомологичным вирусом. Для кроликов иммуногенными являются пептиды с O<sub>1</sub>K-, но не с A<sub>22</sub>-специфичностью. Иммунизация кроликов, не отвечающих в норме на пептид 131—149 A<sub>22</sub>, его смесью с пептидом 136—152 O<sub>1</sub>K приводит к образованию A<sub>22</sub>-специфичных противопептидных антител, не реагирующих перекрестно с пептидом 136—152 O<sub>1</sub>K. Образующиеся антитела обладают вируснейтрализующей активностью.

Ранее небольшие пептиды считались классическими гаптенами — веществами, способными связываться с антителами, но не способными сами по себе вызывать иммунологический ответ. Для придания им иммуногенных свойств обычно проводили их конъюгацию с высокомолекулярными, чаще белковыми, носителями. Однако в настоящее время известно много примеров, когда относительно короткие 10—20-членные пептиды могут индуцировать иммунный ответ самостоятельно, без конъюгации с высокомолекулярным носителем [2, 3]. Указанные свойства реализуются при наличии у пептидов Т-эпитопов. В этом случае пептид, представленный на поверхности антигенпредставляющей клетки в комплексе с молекулами гистосовместимости второго класса, распознается Т-хелперной субпопуляцией лимфоцитов. Активированные Т-хелперы способны дифференцировать антигенспецифичных В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие специфические антитела. Таким образом, если пептид содержит в своей структуре Т- и В-эпитопы, он может служить самостоятельным иммуногеном и не требует дополнительной конъюгации с носителем.

В предыдущих работах [1, 4] мы описали синтез перекрывающихся пептидов с последовательностями фрагментов иммунодоминантного района белков VP<sub>1</sub> штаммов O<sub>1</sub>K и A<sub>22</sub> вируса ящура. Некоторые из синтезированных пептидов проявляли протективную активность на экспериментальных животных не только в виде КЛН-конъюгированных препаратов, но и в свободном виде. Полученные результаты позволили предположить, что эти пептиды включают не только важные В-протективные эпитопы, но и участки, распознаваемые Т-хелперами [5]. Настоящая работа посвящена анализу иммуногенных свойств синтезированных пептидов (см. рис. 1), а также изучению возможного эффекта совместного введения пеп-

\* Сообщение II см. [1].

Принятые сокращения: КЛН — гемоцианин улитки, ИД — инфекционная доза вируса, ТЦД<sub>50</sub> — тканевая цитотоксическая доза вируса.



а

б

Рис. 1. Участки белков VP<sub>1</sub> штаммов O<sub>1</sub>K (а) и A<sub>22</sub> (б) вируса ящура и их синтетические пептидные фрагменты

Иммуногенность синтетических пептидов последовательности белка VP<sub>1</sub> вируса  
ящера штамма O<sub>1</sub>K \*

Иммуноген	Носитель	Кролики			Морские свинки		
		Титр ППА на 55-е сут. —log <sub>10</sub>	Титр ВНА, —log <sub>2</sub> на		Титр ППА на 55-е сут. —log <sub>10</sub>	Титр ВНА на 55-е сут. —log <sub>10</sub>	Число защищенных/число зараженных ***
			30-е сут	на 55-е сут			
145-159	KLH	3,0-4,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5
145-159	—	<1,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5
136-152	KLH	4,4	1,2-2,7	4,1-7,5	4,0	1,0-4,0	4/5
136-152	—	4,4	<1,0	<1,0	3,0	1,0-1,5	5/5
136-148	KLH	3,0-4,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	2/4
136-148	—	3,0-4,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	3/5
141-152	KLH	3,0-4,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5
141-152	—	<1,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5
141-148	KLH	—	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5
141-148	—	<1,0	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5
Вирус	—	—	3,0-4,0	6,5-7,0	—	3,8	4/5
—	—	—	<1,0	<1,0	—	<1,0	0/5

\* ППА — противопептидные антитела; ВНА — вируснейтрализующие антитела.

\*\* Опыт с 10—32 ТЦД<sub>50</sub>; для всех остальных случаев доза вируса составляла 200 ТЦД<sub>50</sub>.

\*\*\* Заражение вирусом O<sub>1</sub>K в дозе, равной 200—500 ИД<sub>50</sub>.

тидов с разной специфичностью. Для этих целей были использованы как свободные пептиды, так и их конъюгаты с KLH, полученные при помощи глутарового альдегида.

Активность полученных препаратов была исследована в опытах по определению титра противопептидных антител методом иммуноферментного анализа (непрямой вариант) и титра вируснейтрализующих антител в сыворотках крови кроликов и морских свинок *in vitro*. Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 44 сут свободным пептидом либо пептидом, конъюгированным с KLH, в дозе 200 мкг (в пересчете на пептид). Первую иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда, а вторую — с неполным.

Как показывают результаты испытаний препаратов с O<sub>1</sub>K-специфичностью (табл. 1), образующиеся с высоким титром противопептидные антитела на конъюгат пептида 145—159 с KLH не обладали вируснейтрализующей и протективной активностью. Эти данные противоречат ранее опубликованным результатам с аналогичным пептидом 144—159 [6]. Наиболее высокую прогнотическую активность проявил пептид 136—152. Защита морских свинок была практически полной (80—100%) после иммунизации как конъюгатом пептида с KLH, так и свободным пептидом, несмотря на то что титр противопептидных антител после иммунизации свободным пептидом был несколько ниже, а образующиеся антитела обладали весьма слабой вируснейтрализующей активностью *in vitro*.

Сходные данные были получены и на кроличьих сыворотках. Так, иммунизация свободным и конъюгированным с KLH пептидом 136—152 приводила к образованию противопептидных антител с одинаковым титром. Тем не менее и в этом случае сыворотки, полученные после иммунизации свободным пептидом, не обладали вируснейтрализующей активностью. Эти результаты согласуются с данными о неполном соответствии между титрами вируснейтрализующих антител *in vitro* и протективным эффектом *in vivo*. Например, при использовании некоторых вируснейтрализующих моноклональных антител было показано значительное увеличение количества вируса, нейтрализуемого антителами *in vivo*, по сравнению с количеством вируса, нейтрализуемого теми же антителами *in vitro* [7]. Нейтрализация вируса *in vitro* осуществляется благодаря образованию недиссоциируемых комплексов вируса с антителами, сопровождаю-

Иммуногенность синтетических пептидов последовательности белка VP<sub>1</sub> вируса ящура штамма А<sub>22</sub>

Иммуноген	Носитель	Кролики			Морские свинки	
		Титр ППА на 55-е сут. —log <sub>10</sub>	Титр ВНА, —log <sub>2</sub> , на		Титр ВНА на 55-е сут. —log <sub>2</sub>	Число защищенных/число зараженных *
			30-е сут	55-е сут		
131—149	KLH	4,0	3,5—4,3	4,3—5,0	4,2	3/4
131—149	—	<1,0	<1,0	<1,0	4,0	4/5
131—139	KLH	3,0	<1,0	<1,0	—	—
131—139	—	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	0/4
140—149	KLH	3,0	3,3—3,5	4,0—4,7	—	—
140—149	—	<1,0	<1,0	<1,0	3,0	2/4
{ 131—149+	—	4,0	<1,0	3,5—5,0	3,0	3/5
{ 136—152 O <sub>1</sub> K	—	—	—	—	—	—
Вирус	—	—	5,5	6,5	3,8	3/4
—	—	—	<1,0	<1,0	<1,0	10/10

\* Заражение вирусом А<sub>22</sub> в дозе, равной 200—500 ИД<sub>50</sub>.

щемуся нарушением структуры вирусного капсида и полной потерей инфекционности. Нейтрализация же *in vivo* может осуществляться благодаря так называемой опсонизации вирусных частиц, т. е. образованию комплекса вирус—антитело, без структурных изменений в вирусном капсиде, с последующим быстрым фагоцитозом этих растворимых комплексов. При этом количество антител, необходимых для нейтрализации вируса *in vivo*, будет значительно меньшим, чем *in vitro*. Кроме того, различия в нейтрализации вируса *in vitro* и *in vivo* может быть обусловлено разными типами образующихся антител. Возможно, что именно с этим связана разница в титрах вируснейтрализующих антител сывороток, полученных при иммунизациях свободным и KLH-конъюгированным пептидом.

Изучение иммуногенности перекрывающихся фрагментов иммунодоминантного района привело к следующим результатам. Пептид 136—148 проявил 50—60% протективный эффект. Как и в случае пептида 136—152, свободный пептид и его конъюгат с KLH проявили сходную активность. Вируснейтрализующая активность сывороток *in vitro* в стандартных условиях (при дозе вируса 100—320 ТЦД<sub>50</sub>) также отсутствовала. Активность в реакции нейтрализации удается обнаружить при снижении дозы вируса до 10—32 ТЦД<sub>50</sub>. При этом вируснейтрализующие титры в сыворотках кроликов, иммунизированных свободным пептидом и его KLH-конъюгатом, практически не различались (табл. 1).

Иммунизация животных конъюгатами пептидов 141—148 и 141—152 не приводила к образованию вируснейтрализующих антител и защите животных. Свободные пептиды 141—148 и 141—152 не обладали собственной иммуногенностью и так же, как пептид 145—159, не индуцировали образование противопептидных антител.

Таким образом, согласно полученным результатам, иммуногенную и протективную активность проявляют два пептида с O<sub>1</sub>K-специфичностью: 136—152 и 136—148. Несмотря на отсутствие вируснейтрализующей активности сывороток, полученных при иммунизации этими пептидами в свободном виде, мы считаем, что их протективный эффект *in vivo* связан с действием образующихся противопептидных антител. Ранее мы предположили, что фрагмент 145—148 VP<sub>1</sub>-белка — участок связывания вируса ящура с клеточным рецептором [8]. Исходя из этого действие противопептидных антител к пептидам 136—152 и 136—148 может быть обусловлено блокированием участка связывания вируса с клеточным рецептором. Существенно, что оба пептида являются полноценными иммуногенами в свободном виде, без конъюгации с белковыми носителями. Можно предполо-

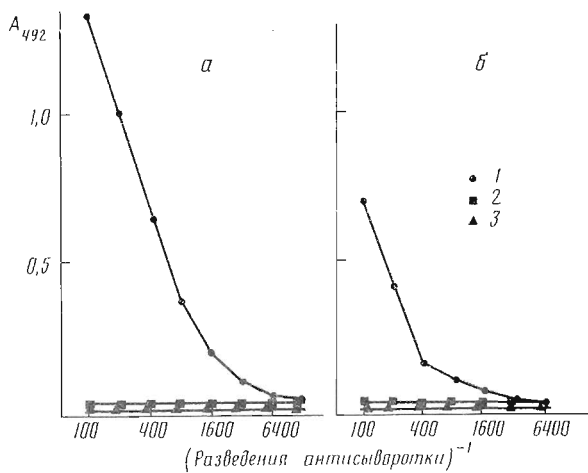


Рис. 2. Кривые связывания кроличьих сывороток с пептидами 131—149  $A_{492}$  (а) и 140—149  $A_{22}$  (б): 1 — анти-131—149-КЛН, 2 — анти-136—152  $O_1K$ , 3 — нормальная кроличья сыворотка

жить, что эти пептиды окажутся пригодными не только для создания у восприимчивых животных специфического иммунитета к штамму  $O_1K$ , но и в качестве носителей других протективных эпитопов.

Сходным образом были изучены синтетические пептиды с  $A_{22}$ -специфичностью (табл. 2). Показано, что иммунизация КЛН-конъюгированными пептидами 131—149 и 140—149 вызывает образование вируснейтрализующих антител у кроликов и морских свинок, а также обеспечивает защиту 80% морских свинок от заболевания. Сходную активность проявляют указанные выше пептиды (без конъюгации с КЛН) на морских свинках. Однако для кроликов неконъюгированные пептиды неиммуногенны и не вызывают образования даже противопептидных антител. N-Концевой фрагмент 131—139 не проявляет протективной активности ни в свободном, ни в конъюгированном с КЛН виде.

Таким образом, иммуногенную и протективную активность проявляют два пептида с  $A_{22}$ -специфичностью: 131—149 и его С-концевой фрагмент — 140—149. Как и пептиды 136—152 и 136—148  $O_1K$ , для индукции иммунного ответа они не требуют конъюгации с белковым носителем. Пептид 131—139 неиммуногенен сам по себе, а образующиеся противопептидные антитела на конъюгат этого пептида с КЛН не обладают вируснейтрализующей и протективной активностью. Другими словами, у  $A_{22}$ -специфичных пептидов (в отличие от  $O_1K$ -специфичных) титры вируснейтрализующих антител, определяемые у морских свинок *in vitro*, коррелируют с протективным эффектом *in vivo*. Кролики же относятся к не отвечающим на указанные выше пептиды животным, т. е. иммунный ответ на эти пептиды находится под I-генным контролем. Это может быть связано с тем, что либо эти пептиды не активируют Т-хелперы, либо ответ на них по каким-то причинам супрессирован. Нам удалось обойти I-генный контроль иммунного ответа на  $A_{22}$ -специфичные пептиды, используя в качестве «индуктора» пептид с  $O_1K$ -специфичностью (табл. 2). Иммунизация кроликов, не отвечающих на пептид 131—149  $A_{22}$ , его смесью с пептидом 136—152  $O_1K$ , приводит к тому, что животные становятся реактивными к пептиду 131—149  $A_{22}$ . Более того, образующиеся противопептидные тела являются вируснейтрализующими.

Оба пептида сильно отличаются друг от друга по первичной структуре, однако имеют одинаковый по последовательности участок (-Arg-Gly-Asp-Leu-). Исходя из этого можно было бы предположить, что описанные выше эффекты обусловлены серологическими реакциями между этими пептидами. Однако как в «непрямом» варианте, так и в конкурентном иммуноферментном анализе перекрестная активность между пептидами с  $O_1K$ - и  $A_{22}$ -специфичностями не была обнаружена. Так, в «непрямом» методе анти-

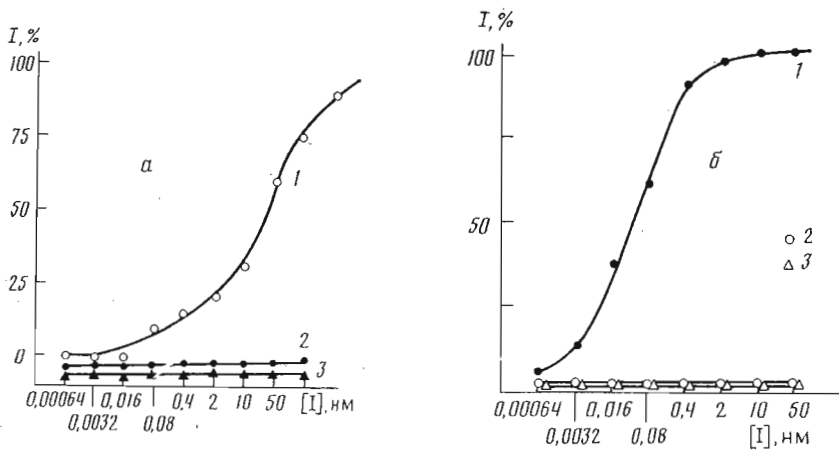


Рис. 3. Ингибирование связывания антител с пептидом 136—152  $O_1K$  (а) и 140—149  $A_{22}$  (б), сорбированным на микроплатах, этими же пептидами в растворе (а, 1 и б, 1) и пептидом 140—149  $A_{22}$  (а, 2) или 136—152  $O_1K$  (б, 2); 3 — контрольный пептид 90—98  $A_{22}$

тела к пептиду 136—152  $O_1K$  не связывались с сорбированными на платах пептидами 131—149 и 140—149  $A_{22}$  (рис. 2). В то же время антитела к КЛН-конъюгату пептида 131—149  $A_{22}$  хорошо связывались и с этим пептидом, и с пептидом 140—149  $A_{22}$  (рис. 2). Отсутствие перекрестной реакции было показано также методом конкурентного иммуноферментного анализа. При этом на платах сорбировали либо пептид 136—152  $O_1K$  (рис. 3а), либо пептид 140—149  $A_{22}$  (рис. 3б), поскольку он обладал перекрестной активностью с пептидом 131—149  $A_{22}$  (рис. 2б), и проводили ингибирование их связывания с антителами кроличьей сыворотки, полученной к смеси этих пептидов. В условиях, когда на плате сорбирован пептид  $O_1K$ , ингибирующую активность проявляет тот же (гомологичный), пептид, но не пептид 140—149  $A_{22}$  (гетерологичный) (рис. 3а). И наоборот, в случае сорбированного пептида 140—149  $A_{22}$  пептид 136—152  $O_1K$  не ингибирует его связывания с антителами, аналогично контрольному пептиду 90—98  $A_{22}$  (рис. 3б).

Из приведенных данных видно, что пептид 136—152  $O_1K$  выступает своего рода «хелпером» в индукции антительного ответа на пептид 131—149  $A_{22}$ , причем образующиеся антитела перекрестно не реагируют с пептидом 136—152  $O_1K$ . Это явление не описано ранее, и причины, по которым иммуногенный пептид индуцирует образование специфических антител к неиммуногенному пептиду, будут исследованы в наших дальнейших работах.

### Экспериментальная часть

Синтез пептидов описан в работах [1, 4]. КЛН-конъюгаты пептидов получали по методу [6].

**Иммунизация животных.** Кроликов массой 2—3 кг и морских свинок массой 0,5 кг первично иммунизировали КЛН-конъюгированными или свободными пептидами в дозе 200 мкг (в пересчете на пептид) с полным адъювантом Фрейнда в подушечки лап или внутримышечно через 42 сут — повторный в той же дозе внутримышечно в неполном адъюванте Фрейнда. Кровь отбирали на 30-е и 55-е сут после первой иммунизации.

**Твердофазный иммуноферментный анализ («непрямой» метод).** Для проведения иммуноферментного анализа использовали 96-луночные платы из полистирола (Dynatech, Швейцария). Антигены в концентрации 10 мкг/мл вносили в лунки плат в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали 16 ч при 4°С. Раствор антигена сливали и трижды промывали лунки 0,01 М Na-фосфатным буфером в 0,1 М NaCl, pH 7,4, содержащим 0,05% твина-20 (PBST). Затем в лунки вносили по 0,1 мл образцов антисывороток в двойных разведениях, начиная с разведения

1 : 20. После инкубаций плат в течение 2 ч при 37° С раствор антисывороток выливали, платы промывали 5 раз PBST и в лунки вносили по 0,1 мл раствора конъюгированных с пероксидазой хрена козьих антител против IgG кролика в разведении 1 : 1000 (Bio-Rad, США). Платы инкубировали 1 ч при 37° С, промывали как описано выше и в лунки вносили по 0,1 мл раствора субстрата (0,05 % *o*-фенилендиамина, 0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в 0,05 М Натритратном буфере, рН 4,5. Окрашивание останавливали добавлением 0,1 мл 12,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> через 2—5 мин. Поглощение измеряли при 492 нм на приборе Uniskan Plus (Flow lab., Великобритания). За титр противопептидных антител принимали соответствующее разведение антисыворотки, дающее окрашивание в 0,1 ОЕ и превышающее фоновый уровень в 4 раза.

*Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ.* 0,05 мл растворов пептидов в 5-кратных разведениях, начиная с концентрации 1 мкМ/мл, смешивали с равным объемом антисыворотки, полученной к смеси пептидов, в разведении 1 : 100, и инкубировали 2 ч при 4° С; 0,1 мл смеси ингибитора и антисыворотки добавляли в лунки плат с предварительно сорбированным антигеном и инкубировали 2 ч при 37° С. Далее анализ проводили, как было описано выше.

*Реакция нейтрализации вируса in vitro.* Для постановки реакции нейтрализации использовали монослойную культуру клеток почки поросят и адаптированный к данной культуре клеток вирус ящура. Испытуемые сыворотки крови инактивировали при 56° С в течение 30 мин. Двукратные разведения сыворотки инкубировали 1 ч при 37° С с равным по объему количеством разведенного вируса, содержащего в 0,1 мл 32—200 ТПД<sub>50</sub> вируса. На каждое разведение сыворотки с вирусом брали не менее четырех пенициллиновых флаконов с культурой клеток свиной почки, куда после слива питательной среды вносили по 0,8 мл свежей поддерживающей среды и по 0,2 мл смеси сыворотки с вирусом. Флаконы помещали на 1 ч в термостат при 37° С. Учет реакции проводили через 48 и 72 ч. Культуру просматривали под малым увеличением микроскопа на наличие цитопатических изменений. Расчет титра вируса и антител осуществляли по формуле Рида и Менча [9].

*Определение протективного эффекта in vivo.* Через 10—14 сут после второй иммунизации 5 привитых и 5 контрольных морских свинок заражали адаптированным к этим животным гомологичным вирусом ящура интраплаттарно в одну из задних конечностей в дозе 200—500 ИД<sub>50</sub> в объеме 0,1 мл в несколько тоннелей. Учет результатов контрольного заражения морских свинок проводили через 3, 5, 7 сут после заражения и оценивали по генерализации ящурного процесса. Генерализацией считали образование вторичных язв хотя бы на одной конечности, в которую вирус ящура не вводили.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вольпина О. М., Суровой А. Ю., Уляшин В. В., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1363—1371.
2. Young C. R., Schmitz H. E., Atassi M. Z. // Molecular Immunology. 1983. V. 20. № 5. P. 567—570.
3. Buus S., Sette A., Colon S. M., Miles C., Grey H. M. // Science. 1987. V. 235. P. 1353—1358.
4. Суровой А. Ю., Вольпина О. М., Сметкова Е. В., Волкова Т. Д., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1352—1362.
5. Surovoy A. Yu., Gelfanov V. M., Volpina O. M., Ivanov V. T. // Peptides. Chemistry and Biology. Leiden: ESCOM, 1988. P. 553—554.
6. Pfaff E., Mussgay M., Bohm H. O., Schulz G. E., Schaller H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 7. P. 869—874.
7. McCullough K. C., Crowther J. R., Carpenter W. C., Brocchi E., Capucci L., De Simone F., Xie Q., McCahon D. // Virology. 1987. V. 157. P. 516—525.
8. Суровой А. Ю., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Дрягалин Н. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 7. С. 965—968.
9. Danbacher G., Fedi M., Perrand J. // Bull. Int. Epiz. 1967. V. 67. № 5—6. P. 691—761.

Поступила в редакцию  
2.III.1989

ANTIGENIC STRUCTURE OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS.  
III. IMMUNOGENIC PROPERTIES OF SYNTHETIC PEPTIDES  
COVERING THE SEQUENCE OF THE IMMUNODOMINANT REGION  
OF VP<sub>1</sub> PROTEINS OF THE O<sub>1</sub>K AND A<sub>22</sub>  
STRAINS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

SUROVOY A. Yu., GELFANOV V. M., VOL'PINA O. M., IVANOV V. T.,  
CHEPURKIN A. V.\*, IVANYUSHCHENKOV V. N.\*, DRYAGALIN N. N.\*, BURDOV A. N.\*

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow: \* All-Union  
Foot-and-Mouth Disease Research Institute, Vladimir*

Immunogenic and protective properties of uncoupled and KLH-conjugated peptides covering the sequence of the immunodominant region of VP<sub>1</sub> proteins of the O<sub>1</sub>K and A<sub>22</sub> strains of foot-and-mouth disease virus have been studied. The uncoupled peptides 136—148 O<sub>1</sub>K, 136—152 O<sub>1</sub>K, 131—149 A<sub>22</sub> and 140—149 A<sub>22</sub> were shown to be immunogenic in guinea pigs and induced 50—100% protection against homologous virus. On the other hand, the A<sub>22</sub> specific peptides, in contrast to the O<sub>1</sub>K peptides, were not immunogenic in rabbits. Immunization of nonresponders with the A<sub>22</sub> specific peptides containing the O<sub>1</sub>K peptide can bypass nonresponsiveness to the A<sub>22</sub> peptide in terms of the antibody production. The induced antibodies showed virus-neutralizing activity in vitro.