



УДК 578.112.083.3 : 578.835.224 : 615.371

© 1992 г. А. А. Дуговской, С. С. Рыбаков,
В. Н. Иванюценок, А. В. Чепуркин, В. Н. Петров,
Н. Н. Дрягалин, А. Н. Бурдов

ЗАЩИТА ЕСТЕСТВЕННО-ВОСПРИИМЧИВЫХ ЖИВОТНЫХ ОТ ЯЩУРА ПЕПТИДОМ, СИНТЕЗИРОВАННЫМ НА ЛИЗИНОВОЙ МАТРИЦЕ

Российский научно-исследовательский ящурный институт, г. Владимир

Синтезирован пептид VP1-(142-158)-МАР (Multiple Antigen Peptide System), состоящий из двух частей — лизиновой матрицы, включающей три уровня остатков лизина, связанных друг с другом, и восьми фрагментов последовательности аминокислот VP1-(142-158) вируса ящура А₂₂550. Введение 20 мкг пептида морским свинкам с полным адъювантом Фрейнда защищало их от заболевания ящуром при заражении гомологичным вирусом в дозе 500 ИД₅₀. Овец иммунизировали однократно в дозе 1 мг. При двукратном введении пептида крупному рогатому скоту в дозе 1,5 мг с неполным адъювантом на основе синтетического масла индуцировался высокий уровень вирусспецифических антител как после первой (5,3–7,6 log₂ НД₅₀/0,1 мл), так и после второй иммунизации (10,2–11,0 log₂ НД₅₀/0,1 мл). Заражение гомологичным вирусом в дозе 10⁴ ИД₅₀ не вызывало заболевания животных. Показана более высокая иммуногенная и протективная активность пептида VP1-(142-158)-МАР по сравнению с его линейным аналогом, пептидом VP1-(141-160).

Ящур является одной из опасных болезней сельскохозяйственных животных, наносящих ощутимый ущерб животноводству. В странах, где ящур эндемичен, для борьбы с ним используют инактивированные вакцины. Однако такие вакцины сами могут быть источником распространения вируса. В связи с этим возникла настоятельная необходимость создания синтетической пептидной вакцины, которая будет лишена ряда существенных недостатков классической инактивированной вакцины.

Известно, что на синтетический пептид VP1-(141-160) вируса ящура О₁К, связанный с гемоцианином фиссурели через С-концевой остаток цистеина, вырабатываются ВНА и обеспечивается защита морских свинок при заражении гомологичным вирусом [1, 2]. Более активным оказался другой пептид из VP1 вируса ящура О₁К, состоящий из 40 аминокислотных остатков и имеющий формулу CC-200-213-PPS-141-158-PCG [3]. В свободном виде он защищал крупный рогатый скот от заражения гомологичным вирусом после однократной иммунизации в дозе 5 мг или двукратного введения 1 мг и 0,2 мг с интервалом в 32 дня. В литературе также имеются сообщения о том, что пептид последовательности VP1-(135-159) вируса ящура А₂₂, введенный в дозе 1 мг дважды через 42 дня, защищал крупный рогатый скот и овец от заболевания ящуром [4].

Сокращения: BSA — бычий сывороточный альбумин; DMS — диметилсульфид; DIEA — диизопропиламин; HOBt — 1-гидроксibenзотриазол; Pam — фенилацетамидометил; TFA — трифторуксусная кислота; TFMSA — трифторметансульфокислота; ВНА — вируснейтрализующие антитела; GMDP — N-ацетилглюкозаамиин-(β1→4)-N-ацетилмурамоиламин-D-изоглутамин; ИД — инфекционная доза вируса; НД — нейтрализующая доза; НАФ, ПАФ — неполный и полный адъювант Фрейнда; НАСМ — неполный адъювант на основе синтетического масла; ИМД — иммунизирующая доза.

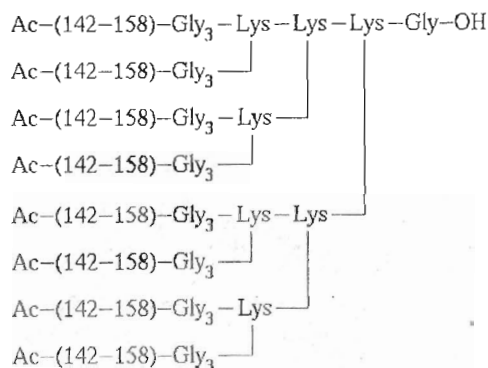


Рис. 1. Структура пептида VP1-(142-158)-МАР вируса ящура А₂₂550

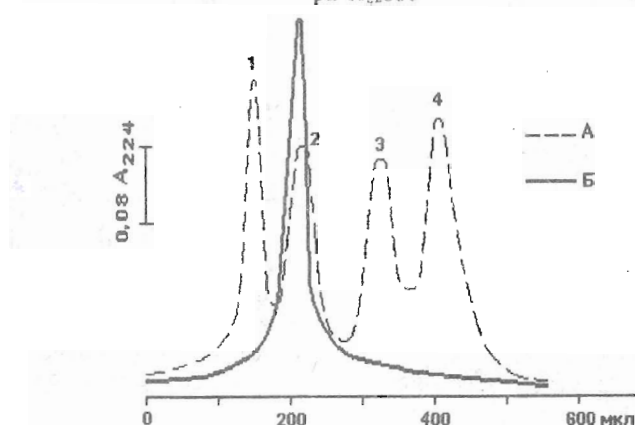


Рис. 2. Микроколоночная гель-эксклюзионная хроматография смеси белков (А) и пептида VP1-(142-158)-МАР (Б): 1 — BSA, 2 — трипсиноген, 3 — лизоцим, 4 — инсулин. Колонка: 0,2×10 см, биогель Р-30, 400 меш. Элюент — 0,07 М фосфатно-натриевый буферный раствор, pH 7,8. Скорость элюции 20 мкл/мин. Объем пробы 5 мкл. Детекция при 224 нм

Об усилении иммуногенности пептида VP1-(142-155) вируса ящура А₂₂ с помощью линейной полимеризации сообщалось в работе [5]. Показано, что свободный пептид или его конъюгат с BSA были слабыми иммуногенами. Полимеризация пептида значительно усиливала его иммуногенные свойства, что проявилось в выработке высокого уровня вируснейтрализующих антител и защите крупного рогатого скота и овец от заражения вирулентным гомологичным вирусом.

Настоящая работа посвящена изучению возможности повышения иммуногенной активности пептида VP1-(141-160) вируса ящура А₂₂ путем синтеза его укороченного аналога VP1-(142-158) на лизиновой матрице (рис. 1).

Синтез пептида на лизиновой матрице (МАР) впервые был описан в работе [6]. МАР состоит из нескольких уровней остатков лизина, связанных друг с другом. Таким образом возникает матрица, на которой можно синтезировать 2*n* пептидных антигенов, где *n* — количество уровней остатков лизина (как правило, оно равно 3). Такая система имеет следующие преимущества:

а) не требуется конъюгации пептидов с белками, синтетическими полимерными носителями или полимеризации пептидов; строение и состав таких конъюгатов, как правило, трудно контролировать;

б) МАР состоит из двух частей — низкомолекулярной лизиновой матрицы и находящихся на ней синтетических пептидов с ацилированной N-концевой аминогруппой; обе части синтезируются стандартным твердофазным методом, что обеспечивает достаточную простоту получения МАР;

в) внутренняя часть МАР содержит обычно семь остатков лизина, что составляет около 10% от общей молекулярной массы, следовательно, МАР состоит на 90% из синтетического пептида, и конструкция характеризуется высокой эпителийной плотностью.

Синтез пептидов проводили твердофазным методом в ручном варианте последовательным наращиванием цепи с C-конца. Пептид VP1-(141-160) синтезировали на хлорметилированном сополимере стирола с дивинилбензолом, а пептид VP1-(142-158)-МАР — на Рам-полимере.

Для защиты α -аминофункции использовали Вос-группу. В ходе синтеза применяли следующие производные трифункциональных аминокислот: Вос-Arg(Tos), Вос-Asp(OBzl), Вос-Glu(OBzl), Вос-Thr(Bzl) и Вос-Lys(Woc). Реакцию конденсации проводили двукратно, первоначально методом симметричных ангидридов, а затем DCC — НОВТ-методом с предварительной активацией аминокислоты. При неполном протекании реакции конденсацию проводили третий раз DCC — НОВТ-методом. При этом полнота протекания реакции достигала более 99%. Остаток Вос-Gln вводили в реакцию первоначально методом пара-нитрофениловых эфиров, а затем DCC — НОВТ-методом.

Деблокирование пептида VP1-(142-158)-МАР осуществляли по следующей схеме: вначале удаляли Вос-группу, аминогруппу ацилировали укусным ангидридом, а затем пептид отщепляли от полимера с одновременным деблокированием в два этапа: смесью TFMSA — TFA — DMS — мета-крезол и 10% TFMSA в TFA в присутствии 10% мета-крезола [7]. Пептид VP1-(141-160) деблокировали аналогично, но аминогруппу не ацилировали.

Для очистки пептида VP1-(142-158)-МАР использовали гель-эксклюзионную хроматографию на колонках с сефадексом G-25 и Toyopearl HW 55F. Пептид VP1-(141-160) очищали на сефадексе G-10 и CM-Toyopearl 650M. Выход пептида VP1-(141-160) составил 15% в расчете на первую аминокислоту. Такой низкий выход, вероятно, объясняется известной побочной реакцией отщепления растущей пептидной цепи от полимера Меррифилда в ходе снятия Вос-группы [8]. Пептид VP1-(142-158)-МАР, синтезированный на Рам-полимере, был получен со значительно большим выходом (60%). Гомогенность пептида VP1-(141-160) анализировали с помощью ВЭЖХ.

Состав пептидов подтвержден аминокислотным анализом (табл. 1). Результаты анализа соответствовали теоретическому составу пептидов в пределах ошибки опыта (20% погрешности). Молекулярную массу пептида VP1-(142-158)-МАР определяли с помощью микроколоночной гель-эксклюзионной хроматографии (рис. 2).

Результаты аналитической гель-эксклюзионной хроматографии позволяют заключить, что пептид VP1-(142-158)-МАР представляет собой соединение с молекулярной массой около 24 кДа без низкомолекулярных примесей. Это значение молекулярной массы больше табличной (16,52 кДа), что, возможно, отражает отличие структуры исследуемого пептида от глобулярной структуры белков, использованных для калибровки колонки.

Иммуногенную и протективную активность пептида VP1-(142-158)-МАР изучали на морских свинках, овцах и крупном рогатом скоте. Из табл. 2 видно, что пептид VP1-(142-158)-МАР значительно превосходит по протективной активности пептид VP1-(141-160) в опытах на морских

Аминокислотный состав пептидов VP1-(141-160) и VP1-(142-158)-МАР

Аминокислота	(141-160)	(142-158)-МАР	Аминокислота	(141-160)	(142-158)-МАР
Met	0,8(1) *	—	Pro	1,2(4)	7,2(8)
Gly	2,1(2)	39,0(41)	Ala	4,2(4)	28,0(32)
Arg	2,8(3)	20,3(24)	Val	0,9(1)	10,1(8)
Asp	1,1(1)	7,6(8)	Thr	1,1(1)	—
Leu	2,9(3)	20,8(24)	Lys	—	7,0(7)
Glu	1,9(2)	14,5(16)			

* В скобках указано теоретическое содержание аминокислот

Таблица 2

Протективная активность пептидов VP1-(141-160) и VP1-(142-158)-МАР на морских свинках

Иммуноген	Доза, мкг	Кратность иммунизации	Адъювант	Защищено/заражено
(141-160)-BSA	200	2	ПАФ, НАФ	5/5
(141-160)	200	2	ПАФ, НАФ	5/5
(141-160)	100	1	ПАФ	2/4
(142-158)-МАР	100	2	ПАФ, НАФ	5/5
(142-158)-МАР	100	1	ПАФ	3/5
(142-158)-МАР	50	1	ПАФ	5/5
(142-158)-МАР	20	1	ПАФ	5/5

Примечание. Заражение 500ИД₅₀ гомологичного вирусного вируса.

Таблица 3

Сравнение 50%-ной иммунизирующей дозы для пептидов белка VP1 вируса лицира A₂₂ на морских свинках

Иммуноген	Адъювант	Доза, мкг	Кол-во животных	Заболело с генерализацией *	ИМД ₅₀ , мкг **
(136-159)	ПАФ	50	5	0	12
		10	5	3	
		2	5	5	
(142-155) ₂₀	НАСМ	100	5	1	12
		20	5	1	
		4	5	5	
(142-158)-МАР	ПАФ	100	3	0	10
		20	5	1	
		4	6	1	
(142-158)-МАР	НАСМ	100	6	1	10
		20	6	2	
		4	6	2	

* Заражение 100 ИД₅₀.** Определение ИМД₅₀ проводили по методу [9].

свинках. Последний при однократной иммунизации в дозе 100 мкг с ПАФ и заражении животных на 28-е сут 500 ИД₅₀ гомологичного вирусного вируса защищал только 50% животных, тогда как пептид VP1-(142-158)-МАР даже в дозе 20 мкг в тех же условиях защищал 100% морских свинок. Пептид VP1-(142-158)-МАР в опытах на морских свинках по определению ИМД₅₀ показал активность не хуже, чем

Таблица 4

Иммуногенная и протективная активность пептида VP1-(142-158)-МАР для овец

Титр ВНА на				Защита
7-е сут	14-е сут	21-е сут	31-е сут	
<1,00	8,17	7,43	7,50	+
<1,00	4,76	н. о. *	7,00	+
<1,00	7,50	10,50	10,17	+
<1,00	7,32	7,33	7,48	+
<1,00	9,24	9,50	9,00	+
Контроль				
<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	0/5

* н. о. — титр не определяли.

Таблица 5

Иммуногенная и протективная активность пептидов белка VP1 вируса ящура А₂₂ для крупного рогатого скота при заражении 10⁶ ИД₅₀

Иммуноген	Адъювант	Доза, мг	Кратность введения	Интервал введения, сут	Титр ВНА, лог:			Наличие первичных поражений после заражения ***	
					21-е сут	42-е сут	63-и сут	пязк	конечности
(141-160)	ПАФ, НАФ	1	2	42	1,0	2,0	6,2	+	+
(141-160)	ПАФ, НАФ	1	2	42	3,0	4,0	6,3	+	+
(141-160), (197-213) смесь	ПАФ, НАФ	1 *	2	36	1,0	1,0	1,0	+	+
(141-160), (197-213) смесь	ПАФ, НАФ	1 *	2	36	3,5	4,6	5,2	+	—
(141-160), (197-213) смесь	НАСМ	1 *	2	42	2,8	2,8	4,0	+	—
(141-160), (197-213) смесь	НАСМ	1 *	2	42	3,0	5,8	6,1	+	—
(142-158) - МАР	НАСМ	1,5	2	42	5,0 **	7,6	11,0	—	—
(142-158) - МАР	НАСМ	1,5	2	42	6,5 **	5,3	10,2	—	—

* По 1 мг каждого.

** Титры ВНА на 30-е сут.

*** «+» — наличие первичных поражений; «—» — отсутствие первичных поражений.

у пептидов VP1-(136-159) и VP1-(142-155)_а, описанных ранее [4, 5] (табл. 3).

Овец иммунизировали однократно в дозе 1 мг с добавлением 1 мг GMDP и НАСМ. Заражение гомологичным вирулентным вирусом в дозе 10⁶ ИД₅₀ проводили на 31-е сут после иммунизации. Из табл. 4 видно, что ВНА в высоких титрах появлялись уже на 14-е сут после введения препарата и сохранялись к 31-м сут на уровне 7-10 log₂ ИД₅₀/0,1 мл, достаточном для защиты животных от ящура.

На крупном рогатом скоте проводили опыты по сравнительной оценке иммуногенной и протективной активности пептидов VP1-(142-158)-МАР, VP1-(141-160) и смеси последнего с пептидом VP1-(197-213), синтез и свойства которого описаны в работе [10].

Результаты, приведенные в табл. 5, показывают, что пептид VP1-(141-160) в свободном виде не обеспечивал защиту животных от зара

жения вирусом ящура в дозе 10^4 ИД₅₀. Через 21 сут после второй иммунизации из четырех животных, иммунизированных смесью пептидов, были защищены три, однако у всех животных были обнаружены первичные поражения. Иммунизация пептидом VP1-(142–158)-МАР обеспечивала защиту обоих животных без появления первичных поражений.

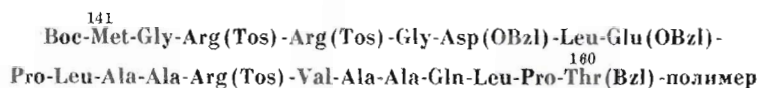
Таким образом, проведенные исследования показывают, что пептид аминокислотной последовательности VP1-(142–158) вируса ящура A₂₂550, связанный с лизиновой матрицей, имел более высокие иммуногенные и протективные свойства по сравнению с мономерной формой.

Экспериментальная часть

В работе использовали реактивы и производные аминокислот фирм Reanal (Венгрия), Fluka (Швейцария), Sigma (США), GMDP Bio-Lar (Латвия). Аминометилованный сополимер стирола и 1% дивинилбензола получали из хлорметилированного фирмы Fluka (0,8 ммоль Cl на 1 г полимера) с помощью фталимида калия [8]. Растворители очищали согласно известным методикам [11]. Для колоночной хроматографии использовали сефадекс G-10 и G-25 (Pharmacia, Швеция), CM-Toyopearl и Toyopearl HW 55F (Toyo Soda, Япония). Для высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии использовали прибор фирмы LKB (Швеция) и колонку TSK ODS (Toyo Soda, 4,6×250 мм, частицы 5 мкм). Элюент — градиент концентрации ацетонитрила от 0 до 70% в 0,05% TFA, создаваемый за 35 мин. Время удерживания пептида VP1-(141–160) на колонке при скорости элюции 1 мл/мин составляло 19,0 мин. Аналитическую микроколоночную гель-эксклюзионную хроматографию выполняли на хроматографе «Милихром» (СССР). Кислотный гидролиз проводили 24 ч в 6 н. HCl при 110°C.

В работе использовали неполный адъювант на основе синтетического масла (НАСМ) ТУ-10-09-108-91.

Boc-Gly-Pam-полимер получали согласно работе [12], исходя из аминометилированного полимера. Boc-Thr(Bzl)-полимер получали реакцией цезиевой соли Boc-Thr(Bzl)-ОН и хлорметилированного сополимера [13].



получали исходя из 2 г Boc-Thr(Bzl)-полимера (нагрузка 0,45 ммоль Thr(Bzl) на 1 г полимера). Использовали следующий протокол каждого синтетического цикла (10–15 мл растворителя на 1 г полимера):

- 1) диоксан (2 промывки по 1 мин);
- 2) 4 н. HCl в диоксане (1 мин);
- 3) 4 н. HCl в диоксане (30 мин);
- 4) диоксан (4 промывки по 1 мин);
- 5) CH₂Cl₂ (2 промывки по 1 мин);
- 6) 5% DIEA в CH₂Cl₂ (2 промывки по 2 мин);
- 7) CH₂Cl₂ (5 промывок по 1 мин);
- 8) 3 экв. симметричного ангидрида Boc-аминокислоты в CH₂Cl₂ (2 ч);
- 9) CH₂Cl₂ (4 промывки по 1 мин);
- 10) 5% DIEA в CH₂Cl₂ (2 мин);
- 11) CH₂Cl₂ (2 промывки по 1 мин);
- 12) DMF (3 промывки по 1 мин);
- 13) 3 экв. НОВТ-эфира той же Boc-аминокислоты в DMF (2 ч);
- 14) DMF (3 промывки по 1 мин);
- 15) CH₂Cl₂ (2 промывки по 1 мин);

- 16) ацилирование смесью $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{Ac}_2\text{O}$ — пиридин (60 : 20 : 20) (1 ч);
- 17) CH_2Cl_2 (3 промывки по 1 мин);
- 18) изопропанол (3 промывки по 1 мин).

Данный протокол в основном совпадает с протоколом, опубликованным в сообщении [10], за исключением процедуры удаления Boc-группы.

Для получения симметричного ангидрида защищенной аминокислоты к 6 экв. Boc-аминокислоты в 15 мл CH_2Cl_2 приливали раствор 3 экв. DCC в DMF при 0°C. После перемешивания в течение 15 мин выпавшую дициклогексимочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакции конденсации. При присоединении защищенных аминокислот к остаткам Gln и Glu осуществляли замену растворителя на DMF во избежание побочной реакции образования пироглутаминовой кислоты. Гидроксипензотриазоловые эфиры получали в результате реакции 3 экв. Boc-аминокислоты, 3 экв. HOBT и 3 экв. DCC в смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{DMF}$ (2 : 1) при 0°C. Время реакции 10 мин. Образовавшуюся дициклогексимочевину отфильтровывали, раствор использовали для проведения реакции конденсации. Присоединение остатка Boc-Gln проводили с помощью 3 экв. пара-нитрофенилового эфира и 3 экв. HOBT, а затем DCC — HOBT методом. Контроль протекания реакции осуществляли с помощью пикринового [14] и нингидринового [15] тестов после стадии 14 и 15 протокола.

141
MGRRGDLEPLAARVAAQLPT

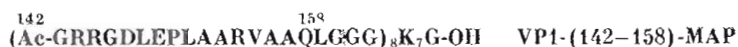
С 500 мг пептидполимера удаляли Boc-группу по протоколу (пункты 1—5), а затем пептид отщепляли от полимера с одновременным деблокированием в 2 этапа. Сначала пептидполимер обрабатывали 4 ч смесью TFMSA — TFA — DMS — мета-крезол (10 : 50 : 30 : 10) при 0°C. Полимер отфильтровывали, реакционную смесь осаждали в эфир (20-кратный избыток) и центрифугировали. После высушивания осадок растворяли в TFA, добавляли мета-крезол до конечной концентрации 10%, охлаждали до 0°C и добавляли TFMSA до 10% (по объему). Реакцию проводили 1 ч, а затем реакционную смесь вновь осаждали в эфир и центрифугировали. Для полноты осаждения в эфир добавляли до 1% пиридина. Осадок растворяли в 0,1 М аммоний-ацетатном буфере, pH доводили до 8 концентрированным аммиаком и оставляли на 1 ч для осуществления O→N-ацильной миграции. Данная процедура необходима для обращения N→O-ацильной перегруппировки на остатке Thr-160, которая могла возникнуть в условиях деблокирования сильными кислотами (HF или TFMSA) серин- и треонинсодержащих пептидов [16]. После этого пептид наносили на колонку с сефадексом G-10, уравновешенным 0,1 н. уксусной кислотой, и обессоливали 2 раза. Фракции, содержащие пептид, упаривали на ротационном испарителе, диофилизировали. Очистку пептида проводили с помощью ионообменной хроматографии на CM-Toyopearl 650M в 0,05 М аммоний-ацетатном буфере, pH 4,5. Выход пептида 93 мг, что составляет 15% в расчете на первую аминокислоту.

Исходя из 2 г Boc-Gly-Pam-полимера (нагрузка 50 мкмоль Boc-Gly на 1 г полимера) получен пептидполимер, представленный на следующей схеме:

142
(Boc-Gly-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Gly-Asp(OBzl)-Leu-Glu(OBzl)-Pro-
158
Leu-Ala-Ala-Arg(Tos)-Val-Ala-Ala-Gln-Leu-Gly-Gly-Gly)₃-Lys-Gly.

К Boc-Gly-Pam-полимеру трижды присоединяли Boc-Lys(Boc) с промежуточными стадиями деблокирования. При этом количество аминокислотных групп увеличивалось в 8 раз и составляло 400 мкмоль на 1 г полимера. К аминокислотным группам присоединяли по 3 остатка Gly и затем по схеме, пред-

ставленной выше, синтезировали пептид последовательности VP1-(142–158) вируса ящура A₂₂550. Для остатков Ala-156, Val-154, Leu-150, Glu-148 и Arg-143 не была достигнута необходимая полнота протекания реакции конденсации, и конденсацию проводили в третий раз с помощью симметричных ангидридов в DMF при 50°С, Arg-143 присоединяли с помощью НОВТ-эфиров в DMF при 50°С. Неотреагировавшие аминокислоты не ацилировали. По окончании синтеза аминокислоты Gly-142 ацилировали уксусным ангидридом в присутствии каталитического количества диметиламинопиридина.



Пептид деблокировали как описано для пептида VP1-(141–160). Осадок после деблокирования растворяли в 10% уксусной кислоте и обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0,1 н. уксусной кислотой, и затем на Toyopearl HW 55F. Элюат детектировали спектрофотометрически при 230 нм. Высокомолекулярную фракцию, содержащую целевой продукт, упаривали на ротационном испарителе и лиофилизировали. Выход пептида 250 мг, что составляет 60% в расчете на первую аминокислоту.

Конъюгацию пептида VP1-(141–160) с BSA осуществляли с помощью глутарового альдегида [2].

Для иммунизации использовали крупный рогатый скот черно-пестрой породы массой 180–200 кг, овец романовской породы массой 20–30 кг и морских свинок массой 400–500 г. Для первичной инъекции раствор пептида смешивали с равным объемом ПАФ или НАСМ. Крупному рогатому скоту и овцам препарат вводили подкожно в объеме 2 мл, морским свинкам — внутримышечно в объеме 0,5 мл. Повторную иммунизацию проводили через 42 сут, используя НАФ или НАСМ.

Для заражения использовали афтозный вирус ящура A₂₂. Крупному рогатому скоту вводили вирус интралиггально на 60-е сут после первой иммунизации в дозе 10⁴ ИД₅₀, овцам — в венчик копыта в той же дозе. Овец иммунизировали однократно и заражали на 31-е сут после вакцинации. Морских свинок заражали интраплантарно вирусом, адаптированным к этому виду животных, в дозе 500 ИД₅₀ на 28-е сут после первой иммунизации или на 14-е сут после второй иммунизации.

Титр ВНА в сыворотках крови определяли в первично трипсинолизированной культуре клеток почки поросенка, используя двукратные разведения сывороток и дозу вируса 30–100 ТЦД₅₀/0,1 мл [17].

Авторы выражают признательность сотруднику ВНИИ Ю. А. Холину за проведение аминокислотного анализа и О. М. Вольниной (ИБХ) за предоставление пептида VP1-(136–159).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Satchiffe J. G., Lerner R. A., Barilands D. J., Brown F. // *Nature*. 1982. V. 298. P. 30–33.
2. Pjuff E., Musgay M., Bohm H. O., Schulz G. F., Schaller H. // *EMBO J.* 1982. V. 1. № 7. P. 869–874.
3. DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., Mowat N. // *Science*. 1986. V. 232. № 4750. P. 639–641.
4. Volpina O. M., Surovoi A. Yu., Ivanov V. T. // *Biomed. Sci.* 1990. № 1. P. 23–32.
5. Павлов А. В., Рыбаков С. С., Иванющенко В. Н., Чепуркин А. В., Петров В. Н., Драгалюк Н. Н., Бурдов А. Н. // *Биоорг. химия*. 1991. Т. 17. № 7. С. 953–963.
6. Tam J. P. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 5409–5413.
7. Tam J. P., Merrifield R. B. // *The Peptides*. 1987. V. 9. Academic Press Inc.
8. Mitchell A. R., Erickson B. W., Ryabitsen M. N., Hodges R. S., Merrifield R. B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1976. V. 98. № 23. P. 7357–7362.

9. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. С. 85-90.
10. Яров А. В., Гельфанов В. М., Гречанинова Л. А., Суевой А. Ю., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Луговской А. А., Дрягалин Н. Н., Иванющенко В. Н., Бурдов А. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1103-1204.
11. Perrin D. D. Purification of Laboratory Chemicals. N. Y.: Pergamon Press, 1980. P. 1-563.
12. Tam J. P., Kent S. B. H., Wong T. W., Merrifield R. B. // Synthesis. 1979. V. 12. P. 955-957.
13. Gisin B. F., Merrifield R. B. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. № 10. P. 6165-6170.
14. Gisin B. F. // Anal. chim. acta. 1972. V. 58. № 1. P. 419-438.
15. Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 2. P. 147-157.
16. Fujino M., Wakimasu M., Shinagawa S., Kitada C., Yajima H. // Chem. Pharm. Bull. 1978. V. 26. P. 539-548.
17. Суевой А. Ю., Гельфанов В. М., Вольпина О. М., Иванов В. Т., Чепуркин А. В., Иванющенко В. Н., Дрягалин Н. Н., Бурдов А. Н. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1185-1191.

Поступила в редакцию
4.II.1992

A. A. LUGOVSKOY, S. S. RYBAKOV, V. N. IVANYUSHCHENKOV, A. V. CHEPURKIN,
V. N. PETROV, N. N. DRYAGALIN, A. N. BURDOV

PROTECTION OF NATURALLY SUSCEPTIBLE ANIMALS AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE BY A PEPTIDE SYNTHESIZED ON A LYSINE MATRIX

Russian FMD Research Institute, Vladimir

A peptide VP1-(142-158)-MAP (Multiple antigen peptide system) consisting of two parts: a lysine matrix made up of three levels of lysine residues coupled with each other and amino acid sequence 142-158 of VP1 of FMD virus strain A₂₂550 - has been synthesized. Guinea-pigs inoculated with 20 mkg of the peptide incorporated with Freund's complete adjuvant were protected against challenge with 500 ID₅₀ of homologous FMD virus. Sheep were immunized with a single inoculation of the peptide in a dose of 1.0 mg. Cattle inoculated twice with 1.5 mg of the peptide with incomplete adjuvant on the basis of synthetic oil developed high virus-specific antibody titres both after the first (5.3-7.6 log₂ ND₅₀/0.1 ml) and the second inoculation (10.2-11.0 log₂ ND₅₀/0.1 ml). The peptide-immunized animals were resistant to challenge with homologous virulent virus in a dose of 10⁴ ID₅₀. The immunogenic and protective capacities of the peptide VP1-(142-158)-MAP were shown to be greater as compared with those of its linear analogue - peptide VP1-(141-160).