

# ПОЛУЧЕНИЕ, ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПОДЛИННОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.А. Калошин, Е.М. Зими́на, Е.О. Калиниченко, Н.А. Михайлова

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

**Резюме.** Целью исследования было получение и характеристика рекомбинантной вакцины, предназначенной для иммунопрофилактики инфекций, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*. При создании вакцины использован комплекс двух высокоиммуногенных рекомбинантных белков *P. aeruginosa*. Первый компонент вакцины представлял собой рекомбинантную форму белка F наружной мембраны (OrgF), а второй — рекомбинантную атоксическую форму (анатоксин) экзотоксина А. Эти антигены позволили разработать вакцину, стимулирующую иммунные реакции против поверхностных структур бактерии и способствующую синтезу нейтрализующих антител против экзотоксина А, одного из наиболее опасных факторов патогенности *P. aeruginosa*. Рекомбинантные белки синтезировали в клетках *Escherichia coli* и выделяли в результате двухэтапной очистки. В случае рекомбинантного белка OrgF на первом этапе получали осадок, содержащий гидрофобную фракцию белков продуцента, а в случае рекомбинантного анатоксина — тельца-включения. На втором этапе проводили аффинную хроматографию в колонках с никель-сефарозой. Очищенные рекомбинантные белки диализовали против буферного раствора, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) и 0,01% Tween 20, а затем стерилизовали фильтрацией. Для исследования были получены три серии рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС), в которой рекомбинантные антигены находились в сорбированном с гидроокисью алюминия состоянии. В этой вакцине рекомбинантный белок OrgF использовали в дозе 25 мкг, а рекомбинантный анатоксин — в дозе 50 мкг. Определение полноты сорбции рекомбинантных антигенов в составе вакцины оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле, используя для нанесения препараты РВС, сконцентрированные ультрафильтрацией в спин-колонках. С целью оценки подлинности рекомбинантной вакцины разработали оригинальный метод. Для этого проводили десорбцию антигенов с последующей концентрацией препарата с помощью спин-колонок. Полученные сконцентрированные десорбированные вакцинные препараты анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттингом, в результате чего подтверждено наличие специфических рекомбинантных антигенов в составе вакцины. Экспериментальные серии РВС проявляли специфическую активность (защитные свойства) в эксперименте на животных (мышях). При этом использована схема двукратной, с двухнедельным интервалом внутрибрюшинной иммунизации, через две недели после которой мышей заражали токсигенной культурой *P. aeruginosa* штамма PA-103. Индексы эффективности защитных

---

**Адрес для переписки:**

Калошин Алексей Алексеевич  
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А,  
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.  
Тел.: 8 (965) 136-51-45 (моб.), 8 (495) 916-25-87 (служебн.).  
Факс: 8 (495) 917-54-60.  
E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

**Contacts:**

Alexei A. Kaloshin  
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazenny lane, 5A,  
Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.  
Phone: +7 (965) 136-51-45 (mobile), 8 (495) 916-25-87 (office).  
Fax: +7 (495) 917-54-60.  
E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

**Для цитирования:**

Калошин А.А., Зими́на Е.М., Калиниченко Е.О., Михайлова Н.А. Получение, оценка специфической активности и подлинности рекомбинантной вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 4. С. 763–770. doi: 10.15789/2220-7619-OES-1369

**Citation:**

Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A. Generation and evaluation of specific activity and authenticity of recombinant vaccine designed preventing against *Pseudomonas aeruginosa* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 4, pp. 763–770. doi: 10.15789/2220-7619-OES-1369

свойств (ИЭ) экспериментальных серий вакцины составляли не менее трех (ИЭ: 3,0–3,3), что превышало в полтора раза эффективность использования компонентов вакцины по отдельности (ИЭ: 2,0–2,3). Таким образом, подтвержден аддитивный эффект использования комплексного препарата для защиты от инфицирования токсигенными штаммами синегнойной палочки.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, белок *F* наружной мембраны (*OprF*), анатоксин, рекомбинантный белок, рекомбинантная вакцина.

## GENERATION AND EVALUATION OF SPECIFIC ACTIVITY AND AUTHENTICITY OF RECOMBINANT VACCINE DESIGNED PREVENTING AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A.

*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** The aim of the study was to obtain and characterize a recombinant vaccine for the immunoprophylaxis of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. A set of two highly immunogenic *P. aeruginosa* recombinant proteins was used to create related vaccine. The first vaccine component was presented by recombinant outer membrane protein F (*OprF*), whereas the second one — by recombinant atoxic exotoxin A (toxoid). These antigens allowed to develop vaccine inducing immune response against the surface bacterial cues and promote production of neutralizing antibodies against exotoxin A, one of the most dangerous *P. aeruginosa* pathogenicity factors. Recombinant proteins were synthesized in *Escherichia coli* cells and isolated by two-step purification. In case of recombinant *OprF* protein, it was initially (stage 1) isolated as a precipitate containing hydrophobic fraction of producer cell-derived proteins, whereas for recombinant toxoid we purified inclusion bodies. At stage 2, a Ni Sepharose column affinity chromatography was performed. Next, purified recombinant proteins were dialyzed against buffer solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 9.0) and 0.01% Tween 20 followed by filtration sterilization. Three lots of the *Pseudomonas* Recombinant Vaccine (PRV) were obtained for the study, wherein the recombinant antigens were absorbed with aluminum hydroxide. Recombinant *OprF* and toxoid protein in vaccine formula were used at a dose of 25 µg and 50 µg, respectively. Absorption completeness of the recombinant antigens within the vaccine was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis with PRV preparations concentrated by ultrafiltration in spin columns. Authenticity of recombinant vaccine was assessed by using customized method by desorbing antigens followed by ultrafiltration concentration in spin columns. Final concentrated desorbed vaccine preparations were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting, which allowed to confirm presence of specific recombinant antigens in the vaccine. The experimental PRV series demonstrated specific activity (protective properties) after inoculation in animals (mice) by using a dual vaccination protocol, wherein mice were immunized intraperitoneally twice with a two-week interval. Next, two weeks later mice were infected by toxigenic *P. aeruginosa* strain PA-103 culture cells. The index of protective efficiency (IE) for experimental vaccine series was at least a value of three (IE: 3.0–3.3) that was by 1.5-fold higher than that for using single vaccine components (IE: 2.0–2.3). Thus, we confirmed an additive effect of using a set preparation to protect against infection caused by toxigenic *Pseudomonas aeruginosa* strains.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane protein F (*OprF*), toxoid, recombinant protein, recombinant vaccine.

## Введение

*Pseudomonas aeruginosa* — условно патогенный микроорганизм, вызывающий гнойно-воспалительные заболевания человека и животных. Обычно синегнойная инфекция развивается как осложнение вследствие ослабления иммунной системы организма, что может быть вызвано различными видами травм и перенесенными заболеваниями. Поскольку *P. aeruginosa* неприхотлива к питательным веществам и обладает высокой устойчивостью к факторам внешней среды и лекарственным препаратам, в том числе и к антибиотикам, синегнойные инфекции имеют широкое распространение в медицинских стационарах [3, 10].

Для иммунопрофилактики гнойно-воспалительных инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, может использоваться активная иммуни-

зация [11]. Ранее рассматривалась перспектива создания вакцин на основе материала, полученного после культивирования производственных штаммов *P. aeruginosa*. В частности, была разработана цельноклеточная инактивированная вакцина, содержащая семь штаммов основных иммунотипов *P. aeruginosa* [8]. Однако такая вакцина не нашла применения в медицинской практике из-за высокой токсичности. Позднее были предприняты попытки получения вакцин на основе разрушенных микробных клеток [1, 7]. Но несмотря на высокую иммуногенность и эффективность этих препаратов, не удалось полностью избавиться от реактогенности, обусловленной примесью липополисахарида клеточной стенки бактерии.

Перспективными оказались препараты на основе очищенных мембранных белков, которые обладали выраженными протективными свой-

ствами и характеризовались отсутствием токсичности [4, 14]. Известны исследования препаратов анатоксинов — химически детоксицированных препаратов экзотоксина А, который является одним из основных факторов патогенности синегнойной палочки [5]. Анатоксин использовали с целью получения донорской плазмы, которая оказалась высокоэффективной при лечении генерализованных форм заболеваний, вызываемых *P. aeruginosa* [6]. Подобные субъединичные вакцины не получили широкого распространения в практике здравоохранения, что связано со сложностью технологического процесса очистки целевых протективных антигенов, а кроме того, с тем, что в случае получения анатоксина остается вероятность реверсии токсичности. Выходом из этой ситуации является использование рекомбинантных белков.

Ранее нами получены и изучены рекомбинантный белок F наружной мембраны (OprF) [12] и рекомбинантная атоксическая форма экзотоксина А (анатоксина) [13]. Комплекс этих рекомбинантных антигенов, сорбированных на геле гидроокиси алюминия, защищал мышей от экспериментальной синегнойной инфекции и проявлял аддитивный эффект [2].

## Материалы и методы

**Синтез рекомбинантных антигенов.** При получении рекомбинантных белков использовали штаммы-продуценты рекомбинантного белка OprF *Escherichia coli* [12] и рекомбинантного анатоксина [13] из коллекции лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. При культивировании первого продуцента использовали LB-среду, содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг в мл и канамицин в концентрации 50 мкг в мл, а при культивировании второго продуцента — LB-среду, содержащую только канамицин в концентрации 50 мкг в мл. Штаммы-продуценты рассевали на агаризованной LB-среде в чашках Петри. Выращенные одиночные колонии после ночной инкубации (12–16 ч) при температуре 37°C использовали для инокуляции 250 мл жидкой среды. Культуру выращивали в термостатированном шейкере в течение 12 ч при температуре 37°C, после чего ее вносили в 2 л свежей LB-среды и инкубировали в прежних условиях в течение 2–3 ч до значения оптической плотности ( $OD_{600}$ ) 0,5. Добавляли 2 мл 1 М ИПТГ и продолжали инкубацию в прежних условиях 3,5 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием. Осадок собирали и замораживали.

**Получение телец-включений.** Осадок бактериальной биомассы, полученной из 10 л культуральной среды, размораживали и растворяли в 300 мл литического буфера (фосфатно-солевой

буфер, 5 мМ ЭДТА, 7 мМ β-меркаптоэтанола). Суспензию подвергали ультразвуковой дезинтеграции на приборе 130-Watt Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, США) в режиме максимальной мощности трижды по 30 с. Нерастворившуюся фракцию осаждали в центрифуге Avanti J-E с ротором JA-14 (Beckman Coulter, США) 20 мин при скорости 5000 об/мин и температуре 4°C, а затем удаляли супернатант. Полученный осадок растворяли в 300 мл раствора следующего состава: 10 ммоль NaCl, 6 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 10 ммоль CaCl<sub>2</sub>, 40 мМ Tris-HCl, pH 8,0, добавляли 6 мкл РНКазы А (10 мг/л) и 15 мкл ДНКазы I (10 мг/мл) и инкубировали 15 мин при температуре 37°C. Повторяли ультразвуковую дезинтеграцию вышеописанным способом. Суспензию центрифугировали 20 мин при скорости 5000 об/мин и температуре 4°C с последующим удалением супернатанта. Осадок трижды промывали следующим образом: ресуспендировали в 100 мл промывочного буфера (фосфатно-солевой буфер, 5 мМ ЭДТА, 20% сахарозы, 1% Triton X-100) и инкубировали 10 мин при температуре 4°C, а затем центрифугировали 20 мин при скорости 5000 об/мин и температуре 4°C. Супернатант удаляли и собирали осадок.

**Получение гидрофобной фракции бактериальных белков.** Осадок бактериальной биомассы, полученной из 10 л культуральной среды, размораживали и растворяли в 210 мл буфера, содержащего 0,3 М NaCl, 0,02 М MgCl<sub>2</sub>, 0,04 М Tris-HCl (pH 8,0). Далее добавляли 250 мкл раствора ДНКазы (10 мг/мл) и 70 мг лизоцима и инкубировали 30 мин при температуре 4°C. Затем добавляли 168 мл 10% раствора Triton X-100 и интенсивно перемешивали. Осаждали нерастворимую фракцию на центрифуге Beckman Avanti J-E (ротатор JA-14) при 5000 об/мин и при температуре 4°C в течение 20 мин, а затем удаляли супернатант.

**Хроматографическая очистка.** Осадок гидрофобной фракции или осадок телец-включений растворяли в одном литре буфера следующего состава: 8 М мочевины, 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 М Tris-HCl, pH 8,0. Растворение осуществляли в орбитальном шейкере со скоростью вращения 70 об/мин в течение 12 ч при комнатной температуре. Затем проводили осаждение нерастворимой фракции лизата, используя центрифугу Beckman Avanti J-E (ротатор JA-14), со скоростью вращения 10 000 об/мин при комнатной температуре в течение часа. К супернатанту добавляли 20–25 мл суспензии Ni-сефарозы (GE Healthcare, США) и инкубировали 1 час при комнатной температуре в орбитальном шейкере с легким покачиванием (60 об/мин). Полученную суспензию пропускали самотеком через хроматографическую колонку (Bio-Rad, США). После прохождения почти всей жидкой фазы колонку подключали к хроматогра-

фу (BioLogic LP, Bio-Rad) и пропускали два литра первого промывочного раствора (8 М мочевины, 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М Tris-HCl, pH 6,3) и 500 мл второго промывочного раствора (8 М мочевины, 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М Tris-HCl, pH 5,9). Элюцию рекомбинантного белка осуществляли буферным раствором следующего состава: 8 М мочевины; 0,1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 М Tris-HCl, pH 4,5.

**Диализ и стерилизация.** Перед проведением диализа pH растворов рекомбинантных белков доводили до значения 9,0 насыщенным раствором гидроксида натрия. Препараты рекомбинантных белков переносили в диализные мешки — целлюлозные диализные мембраны с размером пор для белков с молекулярным весом 14 kDa (Sigma, США). Диализные мешки с препаратами рекомбинантных белков помещали в емкость, содержащую буфер следующего состава: 50 mM раствор Tris-HCl (pH 9,0), 0,01% Tween 20. Объем препаратов рекомбинантных белков в диализном мешке и объем буфера для диализа имели соотношение 1:10. Диализ проводили в холодильном боксе с температурой 2–8°C на мешалке при постоянном перемешивании раствора магнитным перемешивающим элементом. Смену буфера осуществляли пять раз каждые 4 часа. Буферный раствор для пятой (финальной) смены готовили на апиrogenной воде. После диализа проводили стерилизующую фильтрацию препаратов рекомбинантных белков с использованием полисульфоновых фильтров с диаметром пор 0,22 мкм (Sartorius, Германия). После стерилизации препараты хранили при температуре 2–8°C. Концентрацию белков определяли на спектрофотометре Genesys 6 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 280 нм.

**Оценка специфичности рекомбинантных белков.** При анализе рекомбинантных белков использовали методы электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга [15]. В иммуноблоттинге использовали специфические сыворотки крови кроликов, полученные к рекомбинантному белку OprF [12] и рекомбинантному анатоксину [13] из коллекции лабораторий протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

**Сведение компонентов вакцины.** Препараты рекомбинантных антигенов и гель гидроксида алюминия переносили в стерильную бутылку и доводили объем стерильным физиологическим раствором хлорида натрия. Затем в бутылку помещали стерильный магнитный перемешивающий элемент и герметично закрывали крышку. Сорбцию антигена проводили в холодильном боксе с температурой 2–8°C на магнитной мешалке со скоростью вращения 60–100 об/мин в течение 12 ч. Сорбированный препарат разливали в стерильные флаконы, укупоривали и хранили при температуре 2–8°C.

**Оценки стерильности** проводили в соответствии с требованиями «Государственной фармакопеи РФ» [9].

**Десорбция вакцины.** Флакон с вакциной встряхивали, вскрывали и переносили одну дозу (0,5 мл) в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5–2,0 мл. Добавляли 1 мл буферного раствора следующего состава: 0,45 М цитрат натрия, 0,4 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 9,0. Встряхивали пробирку на вортексе и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Затем перенесли содержимое в центрифужную ультрафильтрационную колонку Millipore объемом 15 мл с размером пор мембраны 10 kDa. Проводили центрифугирование в настольной центрифуге Eppendorf 5702 (Eppendorf, Германия) при скорости вращения 2500 об/мин в течение 15–20 мин до достижения объема 100 мкл. Полученный препарат использовали для анализа подлинности компонентов рекомбинантной вакцины.

**Оценка защитных свойств.** Для иммунизации использовали самок белых беспородных мышей весом 16–18 г. При экспериментальном инфицировании животным внутрибрюшинно вводили различные дозы живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* штамма PA-103 в объеме 0,5 мл. Для этого колонии *P. aeruginosa*, выращенные на агаризованной среде Мюллера–Хинтона, смывали изотоническим раствором хлорида натрия и разводили до концентрации  $10^9$  КОЕ (число образующих колонии бактерий) в 1 мл, используя стандарты мутности и спектрофотометр. Из полученной взвеси готовили дозы заражения различной концентрации, осуществляя контроль путем высева на агаризованную среду взвеси культуры, соответствующей минимальной дозе заражения, с последующим подсчетом образовавшихся колоний. Статистическую обработку результатов — определение ЛД<sub>50</sub> в опытных и контрольных группах, а также индекса эффективности (ИЭ) — проводили общепринятыми методами.

## Результаты

**Получение рекомбинантных антигенов.** На первом этапе синтезировали по три серии препаратов рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина, при этом используемым штаммам-продуцентам *E. coli* присвоили название PA-OPRF и PA-ATOX. При синтезе одной серии рекомбинантного белка OprF культивирование проводили в 10 л жидкой среды, а при синтезе рекомбинантного анатоксина — в 20 л жидкой среды.

С целью получения высокоочищенных рекомбинантных белков мы использовали методы их предварительной очистки до хроматографии. При очистке рекомбинантного анатоксина по-

лучали тельца-включения. В то же время рекомбинантный белок OprF после ультразвуковой обработки растворялся и не формировал тельца-включения. Поэтому для его очистки был разработан так называемый «метод получения гидрофобной фракции бактериальных белков», который заключался в ферментативном лизисе бактериальных клеток с обработкой нуклеазами и последующим центрифугированием. Нерастворимый в воде осадок использовали для хроматографической очистки. В итоге после очистки в колонках с никель-сефарозой получены по три серии обоих рекомбинантных белков.

При оценке подлинности препаратов рекомбинантных белков методом электрофореза в полиакриламидном геле определены продукты с размерами около 40 kDa для OprF и около 65 kDa для анатоксина, что соответствовало расчетным параметрам (рис. 1, вклейка, с. II). В иммуноблоттинге эти рекомбинантные белки реагировали со специфическими кроличьими антисыворотками (рис. 2, вклейка, с. II).

После диализа препараты рекомбинантных белков стерилизовали фильтрованием. В тестах по оценке стерильности компонентов вакцины не наблюдали роста посторонней микрофлоры ни в одном опытном образце.

**Получение экспериментальных серий вакцины и их качественная характеристика.** При сведении компонентов вакцины для одной дозы объемом 0,5 мл использовали 25 мкг рекомбинантного белка OprF, 50 мкг рекомбинантного анатоксина и 225 мкг гидроокиси алюминия. После проведения процесса сорбции вакцину разлили в пенициллиновые флаконы и укупирили. В результате были получены три экспериментальные серии вакцины, которые заложены на хранение с целью проведения доклинических исследований и оценки стабильности показателей качества.

Один из важных этапов производства вакцины — это анализ ее подлинности, что определяется наличием самих компонентов — рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина. Однако рекомбинантные белки в вакцине связаны с гидроокисью алюминия. Кроме того, компоненты находятся в разбавленном состоянии, что затрудняет их детекцию. Поэтому были отработаны методы десорбции компонентов вакцины с последующей концентрацией препарата ультрафильтрацией.

Сконцентрированные десорбированные препараты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле. Одновременно проводили анализ полноты сорбции рекомбинантных антигенов в составе вакцины, для чего также проводили концентрацию ультрафильтрацией препаратов вакцины без десорбции. Препараты трех экспериментальных серий вакцины не вхо-

дили в полиакриламидный гель во время электрофореза. В то же время в аналогичных десорбированных препаратах идентифицировались рекомбинантный белок OprF и рекомбинантный анатоксин (рис. 3, вклейка, с. II).

При оценке подлинности вакцины в иммуноблоттинге в препаратах при анализе с антисывороткой к рекомбинантному белку OprF наблюдали специфические бэнды, как в опыте, так и в контроле. Аналогичные результаты получены при иммуноблоттинге с антисывороткой к рекомбинантному анатоксину (рис. 4, вклейка, с. II).

**Исследование защитных свойств рекомбинантных антигенов и вакцины.** Предварительно перед приготовлением экспериментальных серий вакцины рекомбинантные антигены всех серий исследовали на предмет защитных свойств от экспериментальной синегнойной инфекции. При исследовании рекомбинантного белка OprF использовали дозу 25 мкг, а при исследовании рекомбинантного анатоксина — дозу 50 мкг, то есть те же дозы компонентов, что и в составе вакцины. В качестве адъюванта использовали гель гидроокиси алюминия, который добавлялся в соотношении 3:1 к массе рекомбинантного белка. Объем довели физиологическим раствором из расчета 0,5 мл на одну дозу. Проводили двукратную иммунизацию с интервалом 2 недели с последующим через две недели внутрибрюшинным заражением *P. aeruginosa* штамма PA-103.

**Таблица 1. Защитные свойства препаратов рекомбинантных белков серии № 1**

Table 1. Protection by the preparations of recombinant proteins, lot No. 1

Препарат Preparation	Доза заражения, КОЕ* Infection dose, CFU*	Количество мышей павших/ выживших Number of died/ survived mice	ЛД <sub>50</sub> , КОЕ* LD <sub>50</sub> , CFU*	ИЭ** IE**
<b>ОprF, серия № 1</b> OprF, lot No.1	10 <sup>8</sup>	8/2	33,0	2,0
	5,0 × 10 <sup>7</sup>	7/3		
	2,5 × 10 <sup>7</sup>	5/5		
	12,5 × 10 <sup>6</sup>	1/9		
<b>Анатоксин, серия № 1</b> Toxoid, lot No.1	10 <sup>8</sup>	9/1	33,0	2,0
	5,0 × 10 <sup>7</sup>	7/3		
	2,5 × 10 <sup>7</sup>	5/5		
	12,5 × 10 <sup>6</sup>	0/10		
<b>Контроль (интактные мыши)</b> Control (intact mice)	5,0 × 10 <sup>7</sup>	10/0	16,5	—
	2,5 × 10 <sup>7</sup>	7/3		
	12,5 × 10 <sup>6</sup>	3/7		
	6,3 × 10 <sup>6</sup>	1/9		
	3,1 × 10 <sup>6</sup>	0/10		

**Примечание.** \*КОЕ — колониеобразующие единицы, \*\*ИЭ — индекс эффективности.

Note. \*CFU — colony forming units, \*\*IE — index of efficiency.

После курса иммунизации мышам опытных групп вводили от  $6,3 \times 10^6$  до  $10^8$  КОЕ культуры *P. aeruginosa*. Животных контрольных групп (мыши той же партии, которым вводили физиологический раствор хлорида натрия) заражали дозами от  $3,1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^7$  КОЕ культуры. Значение индексов эффективности защитных свойств (ИЭ) было не менее 2,0 (табл. 1 и 2), что соответствовало заданным параметрам. В аналогичном опыте по исследованию опытных серий вакцины индексы эффективности защитных свойств соответствовали для серии 1 — 3,3, для серии 2 — 3,0 и для серии 3 — 3,3 (табл. 3).

### Обсуждение

Предварительно нами определен оптимальный состав рекомбинантной вакцины для профилактики синегнойной инфекции, которая способствует стимуляции иммунных реакций

**Таблица 2. Защитные свойства препаратов рекомбинантных белков серий № 2 и № 3**

Table 2. Protection by the preparations of recombinant proteins, lots No. 2 and No. 3

Препарат Preparation	Доза заражения, КОЕ* Infection dose, CFU*	Количество мышей павших/выживших Number of died/survived mice	ЛД <sub>50</sub> , КОЕ* LD <sub>50</sub> , CFU*	ИЭ** IE**
<b>ОprF, серия № 2</b> OprF, lot No.2	$10^8$	10/0	28,8	2,1
	$5,0 \times 10^7$	6/4		
	$2,5 \times 10^7$	5/5		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
<b>ОprF, серия № 3</b> OprF, lot No.2	$10^8$	9/1	26,8	2
	$5,0 \times 10^7$	7/3		
	$2,5 \times 10^7$	5/5		
	$12,5 \times 10^6$	3/7		
<b>Анатоксин, серия № 2</b> Toxoid, lot No.2	$10^8$	9/1	30,8	2,3
	$5,0 \times 10^7$	7/3		
	$2,5 \times 10^7$	4/6		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
<b>Анатоксин, серия № 3</b> Toxoid, lot No.3	$10^8$	10/0	28,7	2,1
	$5,0 \times 10^7$	8/2		
	$2,5 \times 10^7$	3/7		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
<b>Контроль (интактные мыши)</b> Control (intact mice)	$5,0 \times 10^7$	10/0	13,4	-
	$2,5 \times 10^7$	8/2		
	$12,5 \times 10^6$	4/6		
	$6,3 \times 10^6$	2/8		
	$3,1 \times 10^6$	0/10		

**Примечание.** \*КОЕ — колониеобразующие единицы, \*\*ИЭ — индекс эффективности.

Note. \*CFU — colony forming units, \*\*IE — index of efficiency.

к мажорному поверхностному белку бактериальной клетки и одному из основных факторов патогенности *P. aeruginosa*. Оптимальные дозы антигенов комплексного препарата составили 25 мкг для рекомбинантного белка OprF и 50 мкг для рекомбинантного анатоксина, которые были сорбированы на геле гидроокиси алюминия. Оптимальная схема иммунизации данным препаратом включала в себя два введения с двухнедельным интервалом [2].

Во всех предыдущих исследованиях, посвященных получению и изучению разнообразных протективных антигенов, использовали одностадийную хроматографическую очистку на никель-активированных сорбентах. Однако для получения максимально очищенных компонентов вакцины мы предварительно отделяли основную белковую фракцию бактерий от большей части липополисахарида и нуклеиновых кислот. Рекомбинантный анатоксин обладал сильными гидрофобными свойствами, что позволило ему формировать тельца-включения, которые и использовались для хроматографической очистки. Этот подход оказался

**Таблица 3. Защитные свойства экспериментальных серий рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС)**

Table 3. Protection by the experimental lots of recombinant vaccine pseudomonas (RVP)

Препарат Preparation	Доза заражения, КОЕ* Infection dose, CFU*	Количество мышей павших/выживших Number of died/survived mice	ЛД <sub>50</sub> , КОЕ* LD <sub>50</sub> , CFU*	ИЭ** IE**
<b>РВС, серия № 1</b> RVP, lot No.1	$10^8$	7/3	66	3,3
	$5,0 \times 10^7$	2/8		
	$2,5 \times 10^7$	2/8		
	$12,5 \times 10^6$	0/10		
<b>РВС, серия № 2</b> RVP, lot No.2	$10^8$	7/3	61,6	3
	$5,0 \times 10^7$	3/7		
	$2,5 \times 10^7$	2/8		
	$12,5 \times 10^6$	0/10		
<b>РВС, серия № 3</b> RVP, lot No.3	$10^8$	6/4	66	3,3
	$5,0 \times 10^7$	3/7		
	$2,5 \times 10^7$	1/9		
	$12,5 \times 10^6$	1/9		
<b>Контроль (интактные мыши)</b> Control (intact mice)	$5,0 \times 10^7$	10/0	20,3	-
	$2,5 \times 10^7$	6/0		
	$12,5 \times 10^6$	2/8		
	$6,3 \times 10^6$	0/10		
	$3,1 \times 10^6$	0/10		

**Примечание.** \*КОЕ — колониеобразующие единицы, \*\*ИЭ — индекс эффективности.

Note. \*CFU — colony forming units, \*\*IE — index of efficiency.

неудачным в случае рекомбинантного белка OprF. Однако после лизиса клеток лизоцимом и деградации бактериальной ДНК рекомбинантный белок OprF оказался в нерастворимой форме, поэтому удалось его отделить и также использовать для второго этапа очистки.

Подлинность рекомбинантных антигенов как на стадии получения компонентов вакцины, так и при оценке качества самой вакцины определяли методами электрофореза в полиакриламидном геле и иммуноблоттинга. Расчетная молекулярная масса рекомбинантного белка OprF составляла 38,9 kDa, а молекулярная масса рекомбинантного анатоксина — 65,8 kDa. Рекомбинантные белки соответствующих размеров обнаруживались при анализе продуктов очистки (рис. 1 и 3). Другим показателем подлинности рекомбинантных белков является их специфическое взаимодействие с иммунными сыворотками к охарактеризованным препаратам рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина (рис. 2 и 4).

С целью анализа подлинности вакцины разработан оригинальный метод десорбции рекомбинантной вакцины. Основные методы контроля вакцинных препаратов описаны в XIII издании «Государственной фармакопеи РФ», однако при создании новых препаратов авторы уделяют внимание разработке методов определения подлинности и специфической активности. Подлинности разрабатываемой вакцины определяется путем идентификации рекомбинантного белка OprF и рекомбинантного анатоксина, которые труднодоступны из-за того, что они находятся в связанном с гелем гидроокиси алюминия состоянии, поэтому были подобраны условия их десорбции. Обычно при определении компонентов вакцины используют иммуноферментный анализ, для чего проводится десорбция, в частности в цитратном буфере [16]. В своей работе мы сочетали десорбцию вак-

цины с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и иммуноблоттингом, что позволило выявлять качество рекомбинантных антигенов вакцины. При этом мы столкнулись с проблемой низких концентраций целевых рекомбинантных антигенов на стадии детекции. Выходом из этого стало концентрирование десорбированных препаратов с помощью ультрацентрифугирования.

При анализе специфической активности вакцины использовали модель экспериментального заражения мышей высоковирулентным штаммом синегнойной палочки PA-103, который характеризуется наличием всех основных факторов патогенности, свойственных клиническим изолятам. Выявлено, что вакцина успешно защищала иммунизированных животных, при этом индексы эффективности экспериментальных серий составляли 3,0–3,3. Эти значения в полтора раза превышали индексы эффективности, полученные в экспериментах по оценке протективных свойств отдельных рекомбинантных белков всех серий, значения которых составляли 2,0–2,3. Полученные результаты экспериментов подтверждают правильность выбранной стратегии, когда хорошо проявлялся аддитивный эффект сочетанного использования протективных антигенов.

## Благодарности

Работа выполнена в соответствии с государственным контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

## Список литературы/References

1. Благовидов Д.А., Костинов М.П., Симонова О.И., Шмитько А.Д., Буркина Н.И., Шахназарян М.К. Переносимость вакцины против *P. aeruginosa* у детей с муковисцидозом и врожденными пороками развития легких // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15, № 2 (87). С. 55–66. [Blagovidov D.A., Kostinov M.P., Simonova O.I., Shmit'ko A.D., Burkina N.I., Shahnazaryan M.K. The tolerability of the vaccine against *P. aeruginosa* in children with cystic fibrosis and congenital lung development. *Jepidemiologija i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, vol. 15, no. 2, pp. 55–66. (In Russ.)] doi: 10.31631/2073-3046-2016-15-2-55-66
2. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны и рекомбинантного анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* // Вестник Российской академии медицинских наук. 2016. Т. 71, № 1. С. 17–22. [Kaloshin A.A., Leonova E.I., Soldatenkova A.V., Mikhailova N.A. Assessment protective properties of the recombinant complex of the outer membrane protein F and the toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. *Vestnik Rossijskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2016, vol. 71, no. 1, pp. 117–122. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn584
3. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015. Т. 17, № 3. С. 170–186. [Lazareva A.V., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, vol. 17, no. 3, pp. 170–186. (In Russ.)]

4. Макаренко Т.А., Станиславский Е.С. Иммунологическое изучение белков клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1996. № 2. С. 7–9. [Makarenko T.A., Stanislavskii E.S. An immunological study of the cell-wall proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1996, no. 2, pp. 7–9. (In Russ.)]
5. Патент № 1481962 С Российская Федерация, МПК. А61К 35/74. Способ обезвреживания очищенного экзотоксина А синегнойной палочки; заявлено 1987.07.15; опубликовано 1995.09.06 / Михайлова Н.А., Шаймухаметов Ф.А., Кузнецова Т.Н., Мороз А.Ф. Патентообладатель: УфНИИВС им. И.И. Мечникова, ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. 3 с. [Patent No. 1481962 С Russian Federation, Int. Cl. А61К 35/74. Method for rendering harmless exotoxin А of *Pseudomonas aeruginosa*; application: 1987.07.15: date of publication 1995.09.06 / Mikhailova N.A., Shajmukhametov F.A., Kuznetsova T.N., Moroz A.F. Proprietors: Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut vakcin i syvorotok im. I.I.Mechnikova (UfNIIVS im. I.I. Mechnikova), Nauchno-issledovatel'skij institut jepidemiologii i mikrobiologii im. N.F. Gamalei (GU NIIEM im. N.F. Gamalei). 3 p.]
6. Подгорная Л.Г., Дзюбан Н.Ф. Антигенные свойства анатоксина синегнойной палочки и протективное действие антитоксической противосинегнойной сыворотки // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1986. № 6. С. 67–69. [Podgornaia L.G., Dziuaban N.F. Antigenic properties of *Pseudomonas aeruginosa* anatoxin and the protective action of antitoxic anti-*Pseudomonas aeruginosa* serum. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1986, no. 6, pp. 67–69. (In Russ.)]
7. Станиславский Е.С., Йоо И., Северцева М.К., Машилова Г.М., Болтуцкий Л.Г. Иммунологическая эффективность и безвредность в эксперименте проиммуногена-вакцины против инфекции *Pseudomonas aeruginosa* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1982. № 5. С. 70–75. [Stanislavskii E.S., Joó I., Severtsova M.K., Mashilova G.M., Boltutsii L.G. Experimental immunological effectiveness and safety of pyoimmunogen vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1982, no. 5, pp. 70–75. (In Russ.)]
8. Титова Т.И., Сидорова Т.Н., Радкевич С.А., Анциферова Н.Г., Мороз А.Ф. Получение и изучение свойств поливалентной корпускулярной синегнойной вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1985. № 8. С. 80–88. [Titova T.I., Sidorova T.N., Radkevich S.A., Antsiferova N.G., Moroz A.F. Production and study of the properties of a polyvalent corpuscular *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1985, no. 8, pp. 80–88. (In Russ.)]
9. Фармакопей.рф: сайт о регистрации лекарственных средств в России. Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. [Pharmacopoeia.ru: site about registration of drugs in Russia and EAEU (CIS). General pharmacopoeia monograph GPM.1.2.4.0003.15 Sterility]. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0003-15-sterilnost-3> (10.12.2019)
10. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L., Mohan G., Biswas R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2016, vol. 1, pp. 48–58. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.11.004
11. Döring G., Pier G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 8, pp. 1011–1024. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.12.007
12. Kaloshin A.A., Gatyrova E.V., Mikhailova N.A. Obtaining recombinant forms of the outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* and assessment of their immunogenic properties. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2011, vol. 47, no. 8, pp. 780–788. doi: 10.1134/S0003683811080060
13. Kaloshin A.A., Isakov M.A., Mihailova N.A., Vertiev Ju.V. Preparation of recombinant atoxic form of exotoxin а from *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Exper. Biol. Med.*, 2013, vol. 154, no. 3, pp. 346–350. doi: 10.1007/s10517-013-1947-1
14. Lee N.G., Jung S.B., Ahn B.Y., Kim Y.H., Kim J.J., Kim D.K., Kim I.S., Yoon S.M., Nam S.W., Kim H.S., Park W.J. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. *Vaccine*, 2000, vol. 18, no. 18, pp. 1952–1961. doi: 10.1016/S0264-410X(99)00479-X
15. Sambrook J.F., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001. 2100 p.
16. Shanmugham R., Thirumeni N., Rao V.S., Pitta V., Kasthuri S., Singanallur N.B., Lingala R., Mangamoori L.N., Villuppanoor S.A. Immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay for assessment of in vitro potency of recombinant hepatitis B vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, vol. 17, no. 8, pp. 1252–1260. doi: 10.1128/CI.00192-10

**Авторы:**

**Калошин А.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

**Зими́на Е.М.**, младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

**Калиниченко Е.О.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

**Михайлова Н.А.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

**Authors:**

**Kaloshin A.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Protective Antigens, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

**Zimina E.M.**, Junior Researcher, Laboratory of Protective Antigens, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

**Kalinichenko E.O.**, PhD Student, Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

**Mikhailova N.A.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Protective Antigens, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.01.2020

Принята к печати 16.05.2020

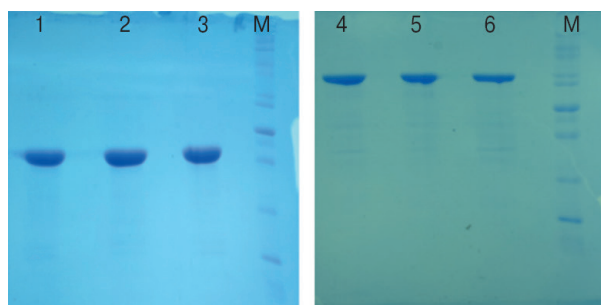
Received 31.01.2020

Accepted 16.05.2020



**Иллюстрации к статье «Получение, оценка специфической активности и подлинности рекомбинантной вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции» (авторы: А.А. Калошин, Е.М. Зимина, Е.О. Калиниченко, Н.А. Михайлова) (с. 763–770)**

Illustrations for the article "Generation and evaluation of specific activity and authenticity of recombinant vaccine designed preventing against *Pseudomonas aeruginosa*" (authors: Kaloshin A.A., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Mikhailova N.A.) (pp. 763–770)

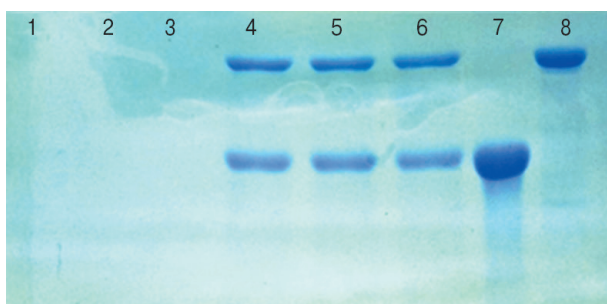


**Рисунок 1. Анализ подлинности рекомбинантных антигенов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Гели, окрашенные Кумасси R-250**

Figure 1. Analysis of the identity of recombinant antigens by polyacrylamide gel electrophoresis. Gels stained by Coomassie R-250

Дорожки: 1, 2, 3 — рекомбинантный белок OprF (серий № 1, 2 и 3); 4, 5, 6 — рекомбинантный анатоксин (серий № 1, 2 и 3); М — весовой белковый маркер Fermentas-SM0661 (200, 150, 120, 85, 70, 60, 50, 40, 30 и 25, 20 и 15 kDa).

Lanes: 1, 2, 3 — recombinant protein OprF (lots No. 1, 2, 3); 4, 5, 6 — recombinant toxoid (lots No. 1, 2, 3); M — molecular-weight marker Fermentas-SM0661 (200, 150, 120, 85, 70, 60, 50, 40, 30 and 25, 20 and 15 kDa).

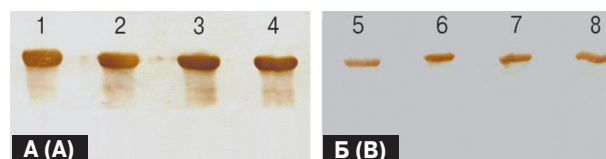


**Рисунок 3. Анализ полноты сорбции и подлинности опытных серий рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Гель, окрашенный Кумасси R-250**

Figure 3. Analysis of the absorption and the authenticity of the experimental lots of recombinant vaccine pseudomonas (RVP) by polyacrylamide gel electrophoresis. Gel stained by Coomassie R-250

Дорожки: 1 — РВС серия № 1; 2 — РВС серия № 2; 3 — РВС серия № 3; 4 — РВС серия № 1 после десорбции; 5 — РВС серия № 2 после десорбции; 6 — РВС серия № 3 после десорбции; 7 — рекомбинантный белок OprF (контроль); 8 — рекомбинантный анатоксин (контроль).

Lanes: 1, 2, 3 — RVP lot No. 1; 2 — RVP lot No. 2; 3 — RVP lot No. 3; 4 — RVP lot No. 1 after desorption; 5 — RVP lot No. 2 after desorption; 6 — RVP lot No. 3 after desorption; 7 — recombinant protein OprF (referent-preparation); 8 — recombinant toxoid (referent-preparation).



**Рисунок 2. Анализ подлинности рекомбинантных антигенов в иммуноблоттинге**  
Figure 2. Analysis of the authenticity of recombinant antigens by immunoblotting

А — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному белку OprF; Б — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному анатоксину. Дорожки: 1, 2, 3 — рекомбинантный белок OprF (серий № 1, 2 и 3); 8 — контрольный препарат рекомбинантного белка OprF; 5, 6, 7 — рекомбинантный анатоксин (серий № 1, 2 и 3); 8 — контрольный препарат рекомбинантного анатоксина.

A — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant protein OprF; B — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant toxoid. Lanes: 1, 2, 3 — recombinant protein OprF (lots No. 1, 2, 3); 8 — referent-preparation of recombinant protein OprF; 5, 6, 7 — recombinant toxoid (lots No. 1, 2, 3); 8 — referent-preparation of recombinant toxoid.



**Рисунок 4. Анализ подлинности опытных серий рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС) в иммуноблоттинге**

Figure 4. Analysis of the authenticity of the experimental lots of recombinant vaccine pseudomonas (RVP) by immunoblotting

А — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному белку OprF; Б — нитроцеллюлозная мембрана, обработанная антисывороткой к рекомбинантному анатоксину. Дорожки: 1 — рекомбинантный белок OprF (контроль); 2 — рекомбинантный анатоксин (контроль); 3 — РВС серия № 1; 4 — РВС серия № 2; 5 — РВС серия № 3.

A — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant protein OprF; B — nitrocellulose membrane after immunoblotting with the antisera to recombinant toxoid. Lanes: 1 — recombinant protein OprF (referent-preparation); 2 — recombinant toxoid (referent-preparation); 3 — RVP lot No. 1; 4 — RVP lot No. 2; 5 — RVP lot No. 3.