

УДК 57.023

Характеристика человеческого моноклонального антитела С6D7-RBD, специфичного к рецепторсвязывающему домену S белка вируса SARS-CoV-2

Я. О. Романенко*, М. В. Силкина, А. С. Карцева, М. А. Марьин, М. А. Шкуратова, М. А. Макарова, А. К. Рябко, Д. А. Конышкова, Н. А. Зенинская, А. Е. Хлынцева, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

*E-mail: muntian.jana@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.11.2022

Принята к печати 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11849

РЕФЕРАТ Новая коронавирусная инфекция COVID-19 — это острое вирусное заболевание, поражающее преимущественно верхние дыхательные пути. Этиологическим агентом COVID-19 является РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2 (сем. Coronaviridae, род *Betacoronavirus*, подрод. *Sarbecovirus*). Нами получено высокоаффинное человеческое моноклональное антитело с авторским названием С6D7-RBD, специфичное к рецепторсвязывающему домену (RBD) S белка вируса SARS-CoV-2 вариант Wuhan-Hu-1, обладающее вируснейтрализующей активностью в тесте с рекомбинантными антигенами: ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) и RBD.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА COVID-19, SARS-CoV-2, рецепторсвязывающий домен, человеческое моноклональное антитело, вируснейтрализующая активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ COVID-19 – (COronaVirus Disease 2019); SARS-CoV-2 – коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2); ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U.S. Food and Drug Administration); чМКА – человеческое моноклональное антитело; МКА – моноклональное антитело; ACE-2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2; RBD – рецепторсвязывающий домен; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФБС – фетальная сыворотка крупного рогатого скота; ИФА – иммуноферментный анализ; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФСБ-Тв – фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween-20; ПААГ – полиакриламидный гель.

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (COronaVirus Disease 2019), вызываемая вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), впервые была зарегистрирована в конце 2019 года в городе Ухань – столице китайской провинции Хубэй. Несмотря на все попытки сдержать заболевание в Китае, вирус распространился по всему миру и вскоре Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила COVID-19 пандемией [1]. На сегодняшний день продолжающаяся пандемия этой инфекции не перестает уносить жизни людей. За небольшой промежуток времени в мире создано немало эффективных вакцин. Однако есть необходимость в создании средств пассивной иммунотерапии

людей в умеренно тяжелых и тяжелых случаях заболевания, к которым относятся препараты на основе человеческих моноклональных антител (чМКА).

Геном вируса SARS-CoV-2 кодирует четыре структурных белка: поверхностный шиповидный гликопротеин S, мембранный M, белок нуклеокапсида N и оболочечный белок E. Белок S обуславливает возможность прикрепления, слияния и проникновения вируса в клетку хозяина. Под действием трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) белок S расщепляется на две субъединицы – S1 и S2 [2, 3]. Непосредственно рецепторное взаимодействие вируса с клеткой хозяина осуществляется через RBD, который расположен в субъединице S1, а затем с помощью субъединицы S2 происходит соединение

мембраны вируса и клетки хозяина [4]. Поэтому RBD является основной мишенью для получения чМКА, потенциально способных нейтрализовать вирус [5].

Исследователи всего мира в условиях быстро нарастающей заболеваемости и высокой смертности в ускоренные сроки разрабатывают инновационные лекарственные препараты, которые, в свою очередь, должны обладать большой клинической эффективностью и безопасностью.

В октябре 2020 года Министерство здравоохранения РФ утвердило применение плазмы от доноров-реконвалесцентов (лиц с подтвержденным случаем COVID-19 в стадии выздоровления) для лечения пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции в связи с отсутствием препаратов для специфического лечения. В методических рекомендациях говорится, что возрастной диапазон донора должен быть от 18 до 55 лет, иметь массу тела более 55 кг, а забор плазмы крови должен проводиться не ранее чем через 14 дней после исчезновения клинических симптомов и двукратном отрицательном результате на РНК SARS-CoV-2 в орофарингеальном мазке, взятом с интервалом не менее 24 ч. Плазма крови должна обладать вируснейтрализующей активностью в разведении 1 : 160, концентрация общего белка в крови не менее 65 г/л [6].

На территории РФ нет опыта использования препаратов на основе моноклональных антител у тяжело больных пациентов, но есть одно запатентованное чМКА, обладающее нейтрализующей активностью, селективно взаимодействующее с RBD-фрагментом в составе S-белка вируса SARS-CoV-2 [7].

Получение чМКА, специфичных к RBD-домену белка S SARS-CoV-2, является перспективным направлением. В данном исследовании охарактеризовано полученное нами чМКА, которое может быть использовано для лечения COVID-19.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для выполнения данной работы нами был выбран донор крови, переболевший новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и через 6 месяцев после выздоровления иммунизированный вакциной «Спутник Лайт» (пр-во ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия). От донора получено письменное информированное согласие на участие в работе. На 7 сутки после вакцинации был проведен забор периферической крови с последующим выделением из нее фракции В-лимфоцитов с помощью коммерческого набора RossetteSep™ Human B Cell Enrichment Cocktail (Stemcell technologies, Канада) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенные В-лимфоциты подвергали электрослиянию с миеломной клеточной линией K6H6/B5 (ATCC® CRL1823™)

на приборе ECM 2001 (ВТХ Harvard Apparatus, США) согласно ранее опубликованной методике [8].

Культивирование полученных гибридом проводили при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Замену культуральной среды проводили 1 раз в трое суток. По достижении монослоя гибридной культуры проводили иммуноферментный анализ (ИФА) с целью выявления гибридом, синтезирующих специфические МКА к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2.

Иммуноферментный анализ

Культуральную жидкость из лунок, в которых наблюдался рост гибридных клеток, тестировали с помощью ИФА в отношении специфического взаимодействия с рекомбинантным RBD вируса SARS-CoV-2 вариант Wuhan-Hu-1 (his-sars2-rbd, Invivogen). Для этого в лунки 96-луночного полистиролового планшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного белка RBD (his-sars2-rbd, Invivogen) в концентрации 1 мкг/мл на лунку в ФСБ и инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч на планшетном орбитальном шейкере (Elmi, Латвия) при скорости вращения платформы 370 об/мин. Затем каждую лунку планшета трехкратно отмывали, внося по 200 мкл ФСБ с добавлением 0.05% Tween-20 (ФСБ-Тв). Затем свободные валентности пластика блокировали молоком с массовой долей жира не более 0.5%, внося по 200 мкл в лунку, и инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч при тех же условиях. После инкубации лунки планшета трехкратно отмывали ФСБ-Тв. Далее в планшет вносили по 100 мкл культуральной жидкости, инкубацию и отмывку планшета проводили при тех же условиях. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с чистым ФСБ, в качестве положительного контроля – ранее проверенную сыворотку крови донора с высоким титром антител к RBD-белку в разведении 1 : 25. После инкубации лунки планшета трижды отмывали ФСБ-Тв. Далее в лунки добавляли антитела кролика против цельной молекулы IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1 : 20000. Планшет инкубировали при тех же условиях в течение 40 мин. По окончании инкубации планшет отмывали 6 раз, затем в лунки планшета вносили по 100 мкл провячного раствора на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию оценивали по появлению синего окрашивания. Интенсивность окрашивания измеряли на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark) при длине волны 655 нм.

Колонии гибридных клеток, показавшие высокую (трехкратно превышающую значение отрицательного контроля) оптическую плотность в ИФА,

клонировали и масштабировали в культуральных флаконах Corning® T-25 и T-75. Далее для работы чМКА гибридную культуру культивировали в колбах 1.6 л Optimum Growth™ Flasks (Thomson Instrument Company, США).

Аффинная хроматография

Для получения чМКА C6D7-RBD культуральную жидкость, в которой культивировались одноименные гибридомы, очищали методом аффинной хроматографии на колонке с Protein G-сефарозой (HiTrap™ Protein G, Швеция) с использованием системы ÄKTA Start (GE Healthcare, США). Выделенные IgG переводили в ФСБ и доочищали методом гель-фильтрации на сорбенте Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, США). Чистоту полученной иммуноглобулиновой фракции проверяли методом SDS-электрофореза по Лэммли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в редуцирующих и не редуцирующих условиях. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250.

Иммуноблот-анализ

Оценку иммунологической специфичности очищенного чМКА C6D7-RBD проводили методом иммуноблоттинга. Для этого рекомбинантный RBD (1 мкг на дорожку) разделяли с помощью ПААГ-электрофореза в редуцирующих условиях, после чего проводили горизонтальный перенос белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare) стандартным методом. По окончании переноса мембрану погружали в обезжиренное (не более 0.5% жирности) молоко для блокировки свободных валентностей нитроцеллюлозы и инкубировали в течение 1 ч при покачивании и температуре 37°C. По окончании инкубации мембрану трижды отмывали ФСБ-Тв и погружали в раствор с чМКА C6D7-RBD с концентрацией 10 мкг/мл в ФСБ. Инкубацию и отмывку мембраны проводили при тех же условиях. чМКА детектировали на мембране козьими антителами против IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma), в разведении 1 : 10 000 в ФСБ. Мембрану инкубировали в течение 40 мин при тех же условиях. После инкубации мембрану отмывали 6 раз ФСБ-Тв и проявляли 1% раствором диаминобензидина в ФСБ с добавлением хлоридов никеля и кобальта, а также 33% пероксида водорода в количестве 1 мкл на 1 мл проявочного раствора.

Определение классовой принадлежности чМКА C6D7-RBD

Для определения подкласса и изотипа очищенного чМКА C6D7-RBD использовали иммунохроматогра-

фический экспресс-тест (Iso-Gold™ Rapid Human Antibody Isotyping Kit, Канада). Перед проведением экспресс-теста все реагенты доводили до комнатной температуры. Опытный образец чМКА C6D7-RBD разводили в 200 мкл буфера для разведения образца (Part Number SDB-004) в соотношении 1 : 100. Затем в пробирку с опытным образцом погружали тест-полоску. Результат анализировали через 5–10 мин.

Определение параметров равновесной константы диссоциации чМКА C6D7-RBD с белком-мишенью RBD

Параметры равновесной константы диссоциации чМКА C6D7-RBD с белком-мишенью RBD определяли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore X-100 (Biacore, Швеция). Эксперимент проводили на сенсорном чипе CM5 в буфере HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0.005% поверхностно-активного вещества P20, pH 7.4). Антитела к гистидину конъюгировали с сенсорным чипом с использованием наборов His Capture Kit type 2 и Amine Coupling Kit (Cytiva, Швеция) в соответствии с инструкцией производителя. Рекомбинантный RBD (10 мкг/мл) наносили на подготовленный чип со скоростью 30 мкл/мин в течение 3 мин. После 10-минутной стабилизации антитело (концентрация от 6.25 до 100 нМ) вводили в течение 3 мин при постоянной скорости потока 40 мкл/мин. Диссоциацию контролировали в течение 90 мин, после чего чип регенерировали 10 mM глицином pH 1.7 в течение 30 с при скорости потока 50 мкл/мин. Сенсорограммы нормализовали путем вычитания базовых значений RU из эталонной проточной кюветы (без захвата чМКА) и анализировали путем подгонки данных к модели связывания Ленгмюра 1 : 1 с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software.

Определение способности чМКА C6D7-RBD ингибировать взаимодействие белка ACE-2 с RBD

Определение вируснейтрализующей активности чМКА C6D7-RBD проверяли в конкурентном ИФА. С этой целью в лунки 96-луночного полистиролового планшета иммобилизовали рекомбинантный вариант белка RBD в концентрации 1 мкг/мл по описанной выше методике. Затем в лунки вносили чМКА C6D7-RBD в концентрации от 10 до 0.078125 мкг/мл с двукратным серийным шагом разведения. Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч. После инкубации лунки планшета трижды отмывали ФСБ-Тв. Следующим этапом в лунки планшета вносили рекомбинантный белок человеческого ACE-2 (fc-hace2, Invivogen), конъюгированный с пероксидазой хрена, с использованием набора LYNX Rapid

HRP Antibody Conjugation Kit (Bio-Rad). Инкубацию и отмывку планшета проводили при тех же условиях. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл проывочного раствора ТМВ. Реакцию оценивали по появлению синего окрашивания раствора. Интенсивность окрашивания измеряли на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark) при длине волны 655 нм. За 100% нейтрализующую активность принимали среднее значение оптической плотности фона (контрольные лунки без иммобилизации RBD, что равносильно случаю, когда он полностью заблокирован антителами), а за отсутствие нейтрализующей активности (0%) принимали среднее значение оптической плотности контрольных лунок, где ACE-2-HRP взаимодействует с RBD без внесения антитела. По контрольным значениям получали линейную функцию, с помощью которой значения оптической плотности в опытных лунках с различным количеством антитела переводили в процентное значение нейтрализующей активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате электрослияния плазмобластов с клетками-партнерами К6Н6/В5 получено 5 гибридом, из которых по итогам скрининга на специфичность синтезируемых ими антител к RBD была выбрана одна гибридома, названная С6D7-RBD. Последующее масштабирование объема культивирования гибридом позволило получить большой объем супернатанта, в котором содержались антитела. Для получения чистой фракции иммуноглобулинов использовали методы хроматографической очистки.

Результаты хроматографической очистки чМКА С6D7-RBD

Чистоту иммуноглобулиновой фракции, полученной методом аффинной хроматографии с последующей доочисткой методом гель-фильтрации, проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10% ПААГ в редуцирующих и не редуцирующих условиях (рис. 1). Положение очищенного чМКА С6D7-RBD на электрофореграмме соответствует его молекулярной массе. Степень чистоты очищенного чМКА С6D7-RBD составила, по данным денситометрии (GE Turphoon FLA 9500, Швеция), не менее 95%.

Иммунологическая специфичность чМКА С6D7-RBD к рецепторсвязывающему домену S-белка вируса SARS-CoV-2

Специфичность чМКА С6D7-RBD в отношении рекомбинантного белка RBD доказали методом иммуноблоттинга. Показано, что чМКА С6D7-RBD характеризуется специфической активностью в отношении рекомбинантного белка RBD (рис. 2).

Результаты иммунохроматографического теста

Согласно данным иммунохроматографического теста исследуемое чМКА С6D7-RBD относится к изотипу G1 иммуноглобулинов класса G и содержит κ -цепь (рис. 3).

Определение равновесной константы диссоциации чМКА С6D7-RBD с белком-мишенью RBD (Ухань)

Параметры аффинного взаимодействия чМКА С6D7-RBD с рекомбинантным белком RBD определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Величина равновесной константы диссоциации (K_D) для чМКА С6D7-RBD составила: $K_D = 5.525 \times 10^{-9}$ М (рис. 4).

Определение RBD-ACE2-нейтрализующей активности чМКА С6D7-RBD

Из представленных на рис. 5 данных видно дозозависимое повышение нейтрализующей активности чМКА С6D7-RBD. При максимальной концентрации 10 мкг/мл чМКА С6D7-RBD наблюдалось практически полное (97%) ингибирование взаимодействия ACE-2 и RBD (Ухань). Добавление чМКА С6D7-RBD в концентрации 0.625 мкг/мл ингибировало ACE-2 – RBD (Ухань) взаимодействие на 36%, а при минимальной концентрации чМКА С6D7-RBD (0.078125 мкг/мл) нейтрализующая активность практически отсутствовала (2%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Получение чМКА с физиологически спаренными тяжелой и легкой цепями, специфичного в отношении выбранной мишени и к тому же обладающего вируснейтрализующей активностью – довольно сложная задача. Нами использованы современные методы цитометрического сортирования с целью получения пула плазмобластов. Мы выбрали стратегию сортирования всей популяции плазмобластов (независимо от их специфичности), но забор крови проводили на 7-е сутки после вакцинации донора вакциной «Спутник Лайт». В ряде работ показано, что количество специфических плазмобластов увеличивается в крови на 7–8 сутки после вакцинации или заболевания [9–11]. Далее для увеличения количества получаемых нами гибридом мы применили метод электрослияния, эффективность которого на порядок выше, чем слияние с ПЭГ [8]. Использование клеточной линии К6Н6/В5 в качестве клеток-партнеров позволило снизить вероятность последующей сегрегации хромосом человека из гибридомы [12]. В результате проведенной нами работы получено 12 гибридом, но только пять оказались специфичными в отношении RBD и только одна гибридома (С6D7-RBD) сохранила способность стабильно синтезировать антитело.

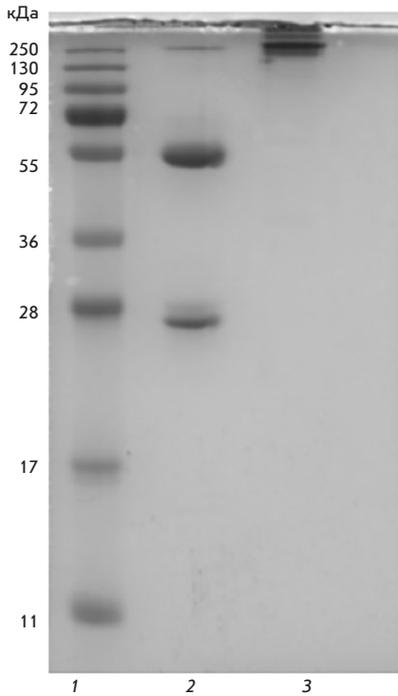


Рис. 1. Электрофореграмма чМКА C6D7-RBD. 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США). 2 – образец чМКА C6D7-RBD в редуцирующих условиях. 3 – образец чМКА C6D7-RBD в не редуцирующих условиях

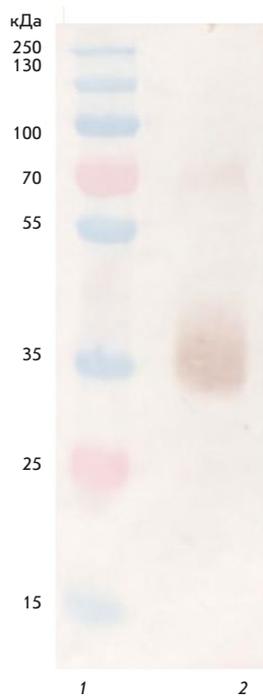


Рис. 2. Определение специфичности чМКА C6D7-RBD в отношении рекомбинантного белка RBD. 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США). 2 – рекомбинантный RBD, детектированный чМКА C6D7-RBD

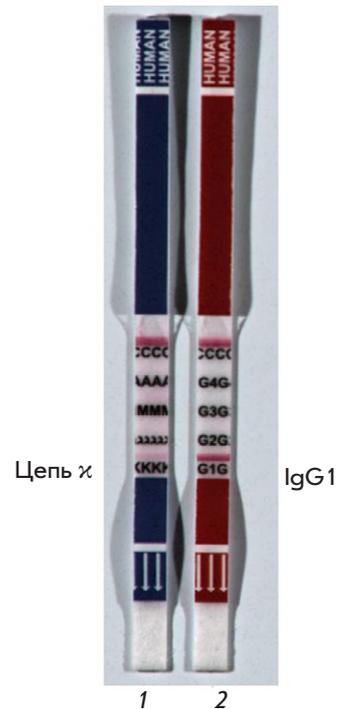


Рис. 3. Классовая принадлежность чМКА C6D7-RBD. 1 – тест-полоска для определения типа легкой цепи и классовой принадлежности иммуноглобулина. 2 – тест-полоска для определения подкласса иммуноглобулина G

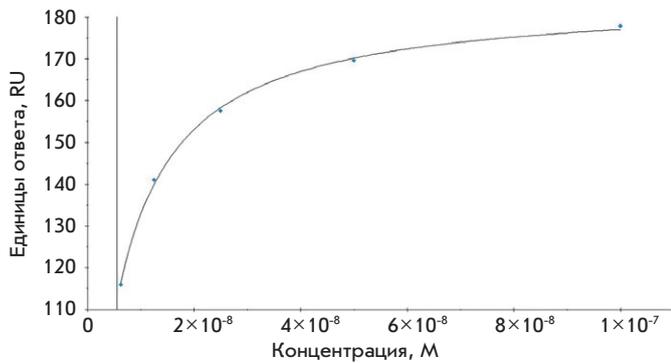


Рис. 4. Результаты определения K_D чМКА C6D7-RBD в отношении белка-мишени RBD

Дальнейший анализ показал, что C6D7-RBD относится к подклассу IgG1 и содержит легкую цепь типа λ . чМКА C6D7-RBD специфично к RBD SARS-CoV-2 с $K_D = 5.525 \times 10^{-9}$ М.

Традиционные методы выявления способности МКА нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 основаны на оценке способности антител ингибировать бляшкообразование или цитопатогенное действие вируса на чувствительной культуре клеток. Работа с виру-

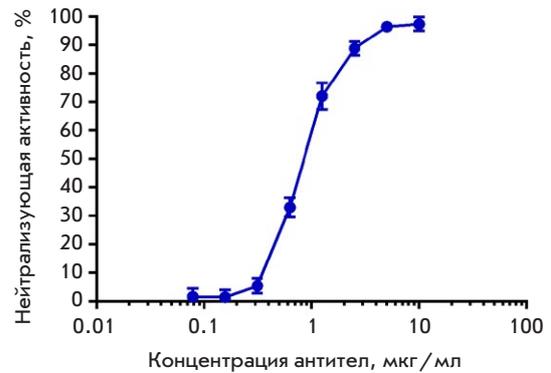


Рис. 5. Определение RBD-ACE2-нейтрализующей активности чМКА C6D7-RBD

сом дикого типа SARS-CoV-2 подразумевает необходимость биоизоляции и проведения исследований в лабораториях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Для облегчения скрининга нейтрализующей активности моноклональных антител или сывороток переболевших/вакцинированных доноров можно использовать «суррогатные» методы. К таким методам относится конкурентный ИФА,

с использованием которого анализируется влияние антител на способность взаимодействия рекомбинантных белков RBD и ACE-2 друг с другом. Этот метод отражает способность антител подавлять проникновение вируса внутрь клетки. В ряде работ показано, что большая часть вируснейтрализующих антител имеет специфичность к RBD поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2, и механизм их действия обусловлен ингибированием способности вируса связываться с вирусным рецептором ACE-2 на поверхности клетки-мишени. С использованием этого метода показано, что чМКА С6D7-RBD в концентрации 10 мкг/мл способно практически полностью блокировать взаимодействие RBD-ACE-2.

В мировой практике уже есть опыт использования препаратов, основой которых являются чМКА. В настоящее время FDA утвердило только три таких препарата для экстренного лечения COVID-19. В 2021 году британская фармацевтическая компания GSK (GlaxoSmithKline) и ее американский партнер Vir Biotechnology выпустили препарат Sotrovimab (VIR-7831) [13]. Препарат состоит из одного чМКА, специфичного к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 [14]. В том же 2021 году компанией AbCellera совместно с Исследовательским центром вакцин США в Национальном институте аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) разработан препарат LY-CoV555/бамлаживимаб и LY-CoV016/этесевимаб [15]. Этот препарат состоит из коктейля чМКА, специфичных к RBD S-белка, а также специфичных к ACE-2 [16]. Третий утвержденный

препарат Казирививимаб и Имдевимаб (REGN10933 и REGN10987), разработанный американской биотехнологической компанией Regeneron Pharmaceuticals, состоит из двух чМКА, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 [17, 18]. Клинические испытания показывают, что для большей эффективности нейтрализации вируса SARS-CoV-2 необходимо использовать коктейль моноклональных антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, полученное нами чМКА С6D7-RBD перспективно для дальнейшего изучения эффективности его применения в качестве отдельного чМКА или в составе коктейля МКА для нейтрализации вируса SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов цитометрического сортирования и гибридной технологии нами получена гибридома, синтезирующая чМКА С6D7-RBD. чМКА С6D7-RBD относится к подклассу 1 IgG, легкая цепь представлена изотипом κ . чМКА С6D7-RBD специфично к RBD SARS-CoV-2 с $K_D = 5.525 \times 10^{-9}$ М и проявляет способность ингибировать взаимодействие между ACE-2 и RBD-белками, что позволяет рассматривать возможную способность данного чМКА нейтрализовать проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР 3.1.3.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan Y., Chang L., Wang L. // Rev. Med. Virol. 2020. V. 30. № 3. P. e2106.
2. Huang Y., Yang C., Xu X.F., Xu W., Liu S.W. // Acta Pharmacologica Sinica. 2020. V. 41. № 9. P. 1141–1149.
3. Kumar S., Chandele A., Sharma A. // PLoS Pathogens. 2022. V. 17. № 9. P. e1009885.
4. Raybould M.I., Kovaltsuk A., Marks C., Deane C.M. // Bioinformatics. 2021. V. 37. № 5. P. 734–735.
5. Xia S., Yan L., Xu W., Agrawal A.S., Algaissi A., Tseng C.T.K., Wang Q., Du L., Tan W., Wilson I.A., et al. // Sci. Adv. 2019. V. 5. № 4. P. eaav4580.
6. Камкин Е.Г. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Временные методические рекомендации. М.: Министерство здравоохранения РФ, 2020.
7. Шахпаронов М.И., Павлюков М.С., Антипова Н.В. Моноклональное антитело к RBD-фрагменту в составе S-белка вируса SARS-CoV-2. Патент РФ на изобретение № 2744274. 2021.
8. Силкина М.В., Карцева А.С., Рябко А.К., Марьин М.А., Романенко Я.О., Калмантаева О.В., Хлынцева А.Е., Шемякин И.Г., Дятлов И.А., Фирстова В.В. // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 2. С. 77–87.
9. Scholzen A., Nahrendorf W., Langhorne J., Sauerwein R.W. // PLoS One. 2014. V. 9. № 7. P. e102885.
10. Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A. // Nat. Medicine. 2004. V. 10. № 8. P. 871–875.
11. Ušaj M., Trontelj K., Miklavčič D., Kandušer M. // J. Membrane Biol. 2010. V. 236. № 1. P. 107–116.
12. Yu X., McGraw P.A., House F.S., Crowe J.E., Jr. // J. Immunol. Meth. 2008. V. 336. № 2. P. 142–151.
13. Tuccori M., Ferraro S., Convertino I., Cappello E., Valdiserra G., Blandizzi C., Maggi F., Focosi D. // MAbs. 2020. V. 12. № 1. P. 1854149.
14. Cathcart A.L., Havenar-Daughton C., Lempp F.A., Ma D., Schmid M.A., Agostini M.L., Guarino B., Di Julio J., Rosen L.E., Tucker H., et al. // bioRxiv. 2021. P. 2021.03.09.434607.
15. Jones B.E., Brown-Augsburger P.L., Corbett K.S., Westendorf K., Davies J., Cujec T.P., Wiethoff C.M., Blackbourne J.L., Heinz B.A., Foster D., et al. // Sci. Translat. Med. 2021. V. 13. № 593. P. eabf1906.
16. Chen P., Nirula A., Heller B., Gottlieb R.L., Boscia J., Morris J., Huhn G., Cardona J., Mocherla B., Stosor V., et al. // New Engl. J. Med. 2021. V. 384. № 3. P. 229–237.
17. Hansen J., Baum A., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Wloga E., Fulton B.O., Yan Y., Koon K., Patel K., et al. // Science. 2020. V. 369. № 6506. P. 1010–1014.
18. VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P., Zost S.J., Crowe J.E., Purcell L.A., Kawaoka Y., Corti D., Fremont D.H., Diamond M.S. // Nat. Medicine. 2022. V. 28. № 3. P. 490–495.