DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117

УДК 616.98:578.834.1

Т.А. Иващенко, Я.О. Романенко, А.С. Карцева, М.В. Силкина, М.А. Марьин, А.Е. Хлынцева, Н.А. Зенинская, И.Г. Шемякин, В.В. Фирстова

Моноклональные антитела, способные ингибировать взаимодействие рецептор-связующего домена вируса SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим рецептором 2 клеток человека

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация

Цель работы – оценить способность моноклональных антител (МКА) ингибировать взаимодействие рецептор-связующего домена (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2 вариантов Wuhan-Hu-1 и BQ 1.1 с ангиотензинпревращающим рецептором 2 клеток человека (ACE2). **Материалы и методы.** В качестве антигенов использованы рекомбинантные RBD вариантов Wuhan-Hu-1 и BQ 1.1. Для наработки мышиных моноклональных антител (мМКА) гибридомы культивировали *in vivo* в организме мышей линии BALB/c. Из асцитической жидкости выделяли мМКА очищением сульфатом аммония с последующей очисткой посредством аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose. Оценку специфической активности мМКА проводили методом иммуноблота с рекомбинантным RBD варианта Wuhan-Hu-1. Для выявления наиболее перспективного мМКА проводили оценку нейтрализующей активности мМКА с помощью метода иммуноферментного анализа посредством иммобилизации RBD на поверхности микропланшета и использования ACE2 в форме конъюгата с пероксидазой хрена. Наработку рекомбинантных антигенов осуществляли в клетках линии ExpiCHO-S (Gibco, США). **Результаты и обсуждение.** В результате исследования охарактеризованы три мМКА: 5C3, 3F11, 1E6. Все антитела относятся к иммуноглобулинам подкласса G и специфически взаимодействуют с RBD S-белка вируса SARS-CoV-2. Установлено, что наиболее эффективное ингибирование взаимодействия ACE2 и RBD штамма BQ 1.1 наблюдалось у мМКА 3F11 (65 %), а при взаимодействии с RBD штамма Wuhan-Hu-1 – у мМКА 5C3 (91 %). Выявленные характеристики позволяют рассматривать антитела в качестве потенциальных кандидатов для создания терапевтических препаратов на основе антител, что расширяет возможности терапии вирусной инфекции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, моноклональные антитела, рецептор-связующий домен, ангиотензинпревращающий фермент 2, нейтрализующая активность.

Корреспондирующий автор: Иващенко Татьяна Александровна, e-mail: ivaschenko_ta@mail.ru.

Для цитирования: Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Хлынцева А.Е., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Моноклональные антитела, способные ингибировать взаимодействие рецептор-связующего домена вируса SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим рецептором 2 клеток человека. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2024; 3:111–117. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117

Поступила 27.04.2024. *Принята к публ.* 13.05.2024.

T.A. Ivashchenko, Ya.O. Romanenko, A.S. Kartseva, M.V. Silkina, M.A. Mar'in, A.E. Khlyntseva, N.A. Zeninskaya, I.G. Shemyakin, V.V. Firstova

Monoclonal Antibodies Capable of Inhibiting the Interaction of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Virus with the Angiotensin-Converting Receptor 2 of Human Cells

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. **The aim** of the work was to evaluate the ability of monoclonal antibodies to inhibit the interaction of the receptor binding domain (RBD) in S protein of SARS-CoV-2 virus variants, Wuhan-Hu-1 and BQ 1.1, with the angiotensin-converting receptor 2 (ACE2). **Materials and methods.** In this study, recombinant RBDs of Wuhan-Hu-1 and BQ 1.1 variants were used as antigens. For mouse monoclonal antibody (mMCA) production, hybridomas were cultured *in vivo* in BALB/c mice. mMCAs were isolated from ascitic fluid by ammonium sulfate treatment followed by purification through column affinity chromatography with Protein G Sepharose sorbent. The specific activity of mMCAs was assessed by immunoblot with recombinant RBD of Wuhan-Hu-1 variant. To identify the most promising mMCA, the neutralizing activity of mMCA was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) via immobilizing RBD on the surface of a microplate and using ACE2 in the form of horseradish peroxidase conjugate. Recombinant antigens were produced in ExpiCHO-S cell line (Gibco, USA). **Results and discussion.** Three mMCAs have been described as a result of the study: 5C3, 3F11, 1E6. All antibodies belong to immunoglobulins of subclass G and specifically interact with the RBD in S protein of SARS-CoV-2 virus. The most effective inhibition of the interaction between ACE2 and the RBD of BQ 1.1 strain was observed for murine MCA 3F11 (65 %), while the interaction with the RBD of Wuhan-Hu-1 strain was inhibited by mMCA 5C3 (91 %). The identified characteristics allow for considering the antibodies as potential candidates for the development of antibody-based therapeutics, thus expanding the possibilities of therapy for SARS-CoV-2 virus infection.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, monoclonal antibodies, receptor-binding domain, angiotensin-converting enzyme 2, neutralizing activity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The work was carried out within the framework of state R&D assignment 3.1.3.

Bioethics: All stages of the study complied with the legislation of the Russian Federation, international ethical standards and regulatory documents of the institution, and were also approved by the relevant Committees.

Corresponding author: Tatiana A. Ivashchenko, e-mail: ivaschenko_ta@mail.ru.

Citation: Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Kartseva A.S., Silkina M.V., Mar'in M.A., Khlyntseva A.E., Zeninskaya N.A., Shemyakin I.G., Firstova V.V. Monoclonal Antibodies Capable of Inhibiting the Interaction of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Virus with the Angiotensin-Converting Receptor 2 of Human Cells. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2024; 3:111–117. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117
Received 27.04.2024. *Accepted* 13.05.2024.

Ivashchenko T.A., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4908-2524
Romanenko Ya.O., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1698-6516
Kartseva A.S., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3159-6439
Silkina M.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5329-2807
Mar'in M.A., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0560-915X
Khlyntseva A.E., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0052-2602
Zeninskaya N.A., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5388-292X
Shemyakin I.G., ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9667-1674
Firstova V.V. ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9898-9894

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, впервые зарегистрированная в г. Ухань провинции Хубей Китая в декабре 2019 г., с высокой скоростью распространилась более чем в 200 странах мира, и 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила о пандемии [1, 2].

С момента появления COVID-19 геном вируса SARS-CoV-2 претерпел множество мутаций. Известно пять генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, включая альфа (B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1), дельта (B.1.617.2) и омикрон (B.1.1.529) [3–5]. Волны, вызванные новыми вариантами, быстро сменяли друг друга, при этом наблюдалось снижение тяжести клинических проявлений и уменьшение смертельных случаев по сравнению с предшествующим вариантом. Омикрон (B.1.1.529) стал доминирующим типом среди предыдущих циркулирующих вариантов COVID-19 и быстро распространился по всему миру с появлением новых линий: BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 – и подлиний, включая BA.1.1, BA.2.12.1, BA.2.11, BA.2.75 и BA.4.6.

Для профилактики и лечения COVID-19 используются вакцинные и противовирусные препараты. Однако из-за спонтанного появления новых вариантов SARS-CoV-2 необходимо постоянно подтверждать эффективность уже разработанных и утвержденных к применению вакцин. Важным терапевтическим средством против вирусных заболеваний, особенно для групп населения, имеющих противопоказания для вакцинации, являются антитела, способные нейтрализовать вирус [6, 7].

С начала пандемии COVID-19 во всем мире разработано, испытано и одобрено для клинического применения несколько моноклональных антител (МКА) [8]. Появление новых вариантов SARS-CoV-2 привело к потере эффективности большинства МКА. Несмотря на существенное уменьшение доли тяжелого течения COVID-19, нейтрализующие МКА по-прежнему остаются самым эффективным средством этиотропной терапии благодаря их способности предотвращать прогрессирование заболевания сразу после введения и ускорять выздоровление независимо от полноты выработки иммунитета у пациента [7, 9].

Структурными белками вируса SARS-CoV-2 являются S (spike), E (envelope), M (membrane) и N (nucleocapsid). Иммунный ответ при инфицировании коронавирусом вырабатывается на все его структурные антигены, но наиболее значимыми иммуногенами являются белки S и N.

Для запуска инфекционного процесса вирус SARS-CoV-2 должен проникнуть в клетку, что подразумевает этап слияния, опосредованный вирусным гликопротеином (S) [10]. Большинство геномных мутаций сосредоточены в S-белке, который обусловливает прикрепление и проникновение вируса в клетку за счет связывания с рецептором клетки-хозяина, человеческим ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) [11]. Белок S состоит из двух субъединиц: амино-концевой субъединицы S1 и субъединицы S2. В ходе инфекционного процесса вируснейтрализующие антитела вырабатываются преимущественно к субъединице S1, а именно к рецептор-связующему домену (RBD), что делает его главной мишенью для создания вакцин и получения лекарственных препаратов на основе МКА [12].

Вируснейтрализующие антитела, направленные к RBD поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 при взаимодействии с ним, блокируют способность вируса связываться с рецептором клеток человека ACE2 [10].

Цель работы – оценить способность мышиных МКА (мМКА) ингибировать взаимодействие RBD S-белка двух штаммов вируса SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1 и BQ 1.1) с его целевым рецептором ACE2.

Материалы и методы

Используемые антигены. Для иммунизации лабораторных животных использовали рекомбинантный антиген RBD варианта Wuhan-Hu-1, состоящий из домена RBD (аминокислоты T333-K528), слитого с кристаллизующимся фрагментом IgG человека (RBD-Fc) методом, описанным в предыдущем исследовании [13].

Получение гибридом, синтезирующих мМКА. Для получения МКА, специфичных к RBD-домену S-белка вируса SARS-CoV-2, мышей линии BALB/c иммунизировали двукратно рекомбинантным RBD, химеризованным с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина IgG в дозе 100 мкг/мышь, эмульгированным с полным адъювантом Фрейнда и гидроксидом алюминия ($Al(OH)_3$) [13]. На третьи сутки после последней иммунизации у гипериммунных мышей извлекали селезенки для выделения спленоцитов ($1 \cdot 10^8$ клеток) и проводили гибридизацию с помощью системы для электрослияния клеток BTX

ECM 2001 (Harvard Bioscience, США) с клетками-партнерами Sp2/0-Ag14 ($1 \cdot 10^7$ клеток). Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены соответствующими комитетами. Параметры и методика для электрослияния описаны в нашей предыдущей работе [14]. После гибридизации проводили HAT-селекцию под давлением, скрининг, клонирование и масштабирование гибридных клеток.

Культивирование гибридом in vivo и очистка. Мышам линии BALB/c, заранее обработанным пристаном (Sigma, США), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки 5C3, 1E6 и 3F11 в пределах от $5 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ в среде RPMI без фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Забор асцитической жидкости проводили на 10–21-е сутки. Выделение иммуноглобулиновой фракции из асцитической жидкости проводили посредством аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Protein G Sepharose (GE Healthcare, Великобритания) с последующей доочисткой на колонке Superdex 200. Чистоту выделенных мМКА оценивали методом SDS-электрофореза по Лэммли с окраской геля Кумасси R-250 в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих и неденатурирующих условиях.

Определение специфической активности мМКА к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2. Оценку иммунологической специфичности очищенных мМКА 5C3, 1E6 и 3F11 проводили методом иммуноблота (вестерн-блоттинг) с рекомбинантным RBD. Рекомбинантные белки RBD подвергали электрофорезу в 12 % ПААГ, после чего осуществляли горизонтальный перенос из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare, Великобритания) с помощью оборудования Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, США). После завершения переноса мембрану блокировали погружением в молоко с массовой долей жира не более 0,5 % и инкубировали в течение 1 ч на орбитальном термостатируемом шейкере при 300 об/мин и температуре 37 °C. Далее, после трехкратной промывки фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,5 % Твин-20 (ФСБ-Т), мембраны инкубировали с мМКА 5C3, 1E6 и 3F11 в концентрации 10 мкг/мл в ФСБ, инкубацию проводили при тех же условиях. После трехкратной отмывки мембраны инкубировали с антителами к суммарной фракции IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (A9044, Sigma, США) в разведении 1:10000 в буфере ФСБ-Т в течение 40 мин. Затем мембрану промывали 5 раз в ФСБ-Т. Визуализацию реакции проводили раствором субстратной смеси на основе диаминобензидина (0,05 % диаминобензидина [Sigma, США], 0,015 % H_2O_2 в ФСБ, pH 7,4). Реакцию останавливали после отчетливо различимого окрашивания образцов путем погружения мембраны в дистиллированную воду.

Определение классовой принадлежности мМКА. Для определения классовой принадлежности мМКА 5C3, 1E6, 3F11 использовали иммунохроматографический экспресс-тест IsoQuick™ Strips for Mouse Monoclonal Isotyping (Envirologix, США). Готовили разведения каждого мМКА в концентрации 1 мкг/мл в 200 мкл буфера ФСБ и погружали тест-полоску до проявления контрольной полосы.

Определение равновесной константы диссоциации мМКА с белком-мишенью RBD. Величину равновесной константы диссоциации для мМКА 5C3, 1E6 и 3F11 определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore X-100 (Biacore, Швеция). Анализ проводили на сенсорном чипе CM5 в буфере HBS-EP (10 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 3 мМ 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 варианта Wuhan-Hu-1 (10 мкг/мл) наносили на чип со скоростью 30 мкл/мин в течение 3 мин. После 10-минутной стабилизации антитело (концентрации в диапазоне 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 мМ 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 мМКА) и анализировали путем подгонки данных к модели связывания Ленгмюра 1:1 с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software.

Определение способности мМКА 5C3, 1E6, 3F11 ингибировать взаимодействие белка ACE-2 с белком RBD (Wuhan-Hu-1) и RBD (BQ 1.1). Определение нейтрализующей активности мМКА 5C3, 1E6, 3F11 проверяли с помощью метода иммуноферметного анализа (ИФА). Для этого в лунки 96-луночного полистиролового планшета иммобилизовали рекомбинантный белок RBD (Wuhan-Hu 1) и RBD (BQ 1.1) в концентрации 1 мкг/мл. Затем в лунки планшета вносили мМКА 5C3, 1E6, 3F11 в концентрации от 10 до 0,78125 мкг/мл с двукратным серийным шагом разведения. Следующим этапом в лунки планшета вносили рекомбинантный белок человеческого ACE2, конъюгированный с пероксидазой хрена с использованием набора LYNX Rapid HRP Antibody Conjugation Kit (Bio-Rad). После каждого этапа внесения нового образца планшет инкубировали при температуре 37 °C в течение 1 ч и трижды отмывали ФСБ-Т. Проявку результатов осуществляли добавлением в лунки планшета по 100 мкл проявочного раствора на основе 3,3’,5,5’-тетраметилбензидина (TMB). Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 4N серной кислоты. Детекцию проводили на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark, США) при длине волны 450 нм. В качестве контроля использовали лунки без

иммобилизации RBD, что равносильно случаю, когда он полностью заблокирован антителами. За 100%-ю нейтрализующую активность считали 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 ACE2-HRP взаимодействует с RBD без внесения антител. 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 и обсуждение

Получение и очистка мМКА 5С3, 1Е6, 3F11. Большинство МКА, способных нейтрализовать вирус SARS-CoV-2, специфичны к RBD S-белка [15]. В нашей предыдущей работе в результате гибридизации методом электрослияния получено 17 гибридных клонов, продуцирующих мМКА к RBD S-белка SARS-CoV-2. Из них наибольшей стабильностью, пролиферативной и антителопродуцирующей активностью *in vitro* обладали три гибридомы: 5С3, 1Е6 и 3F11 [13]. С целью получения достаточного количества МКА гибридомы 5С3, 1Е6 и 3F11 культивировали *in vivo* в организме мышей. После формирования асцита мышей декапитировали, забирали асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела.

Чистоту полученной иммуноглобулиновой фракции методом аффинной хроматографии с последующей доочисткой методом гель-фильтрации проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10 % ПААГ в денатурирующих и неденатурирующих условиях (рис. 1).

Определение иммунологической специфичности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1). Специфичность мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 в отношении рекомбинантного белка RBD варианта Wuhan-Hu-1 доказали методом иммуноблотинга. Показано, что мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 обладали высокой специфичностью в отношении

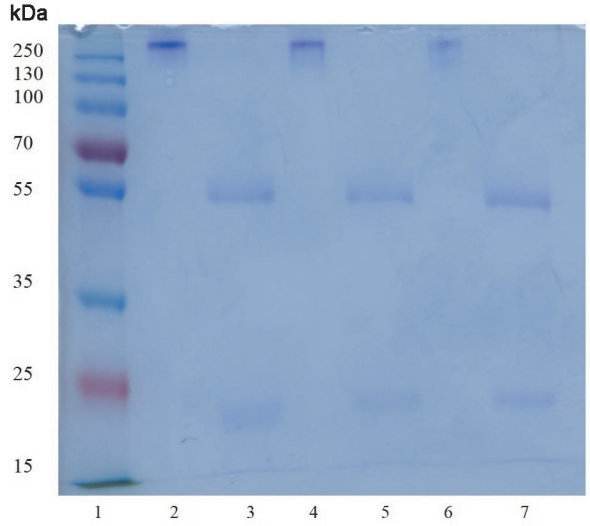

Рис. 1. Электрофореграмма очищенных мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 в 10 % ПААГ:

1 – маркеры молекулярных масс PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); *2* – образец МКА 5С3 в неденатурирующих условиях; *3* – образец МКА 5С3 в денатурирующих условиях; *4* – образец мМКА 1Е6 в неденатурирующих условиях; *5* – образец мМКА 1Е6 в денатурирующих условиях; *6* – образец мМКА 3F11 в неденатурирующих условиях; *7* – образец мМКА 3F11 в денатурирующих условиях

Fig. 1. Electrophoregram of purified mMCA 5C3, 1E6, 3F11 in 10 % polyacrylamide gel:

1 – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder molecular mass markers (Thermo Fisher Scientific, USA); *2* – mMCA 5C3 sample under non-denaturing conditions; *3* – mMCA 5C3 sample under denaturing conditions; *4* – mMCA 1E6 sample under non-denaturing conditions; *5* – mMCA 1E6 sample under denaturing conditions; *6* – mMCA 3F11 sample under non-denaturing conditions; *7* – mMCA 3F11 sample under denaturing conditions

рекомбинантного белка RBD варианта Wuhan-Hu-1 (рис. 2).

Определение подклассовой специфичности. Результаты иммунохроматографического теста показали, что исследуемые мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 относятся к изотипу G1 иммуноглобулинов класса G и содержат к-цепь (рис. 3).

Определение равновесной константы диссоциации мМКА5С3, 1Е6, 3F11 с RBD SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1). Аффинное взаимодействие мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 с рекомбинантным белком RBD-His определяли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе Biacore X100 (GE Healthcare, США). Величина равновесной константы диссоциации (KD) для мМКА 5С3, 1Е6,

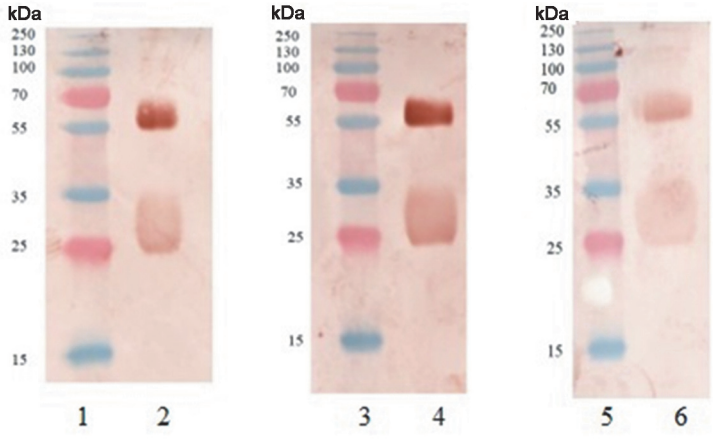

Рис. 2. Определение иммунологической специфичности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 с белком мишенью RBD:

1, *3*, *5* – маркеры молекулярных масс PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); *2* – рекомбинантный RBD, детектированный мМКА 5С3; *4* – рекомбинантный RBD, детектированный мМКА 1Е6; *6* – рекомбинантный RBD, детектированный мМКА 3F11

Fig. 2. Determination of immunologic specificity of mMCAs 5C3, 1E6, 3F11 with RBD target protein:

1, *3*, *5* – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder molecular mass markers (Thermo Fisher Scientific, USA); *2* – recombinant RBD detected by mMCA 5C3; *4* – recombinant RBD detected by mMCA 1E6; *6* – recombinant RBD detected by mMCA 3F11

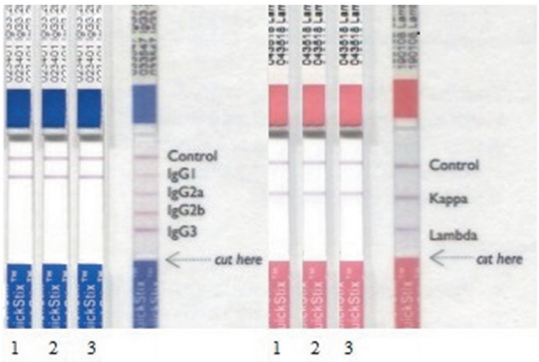

Рис. 3. Классовая специфичность мМКА:
1 – мМКА 5С3; *2* – мМКА 1Е6; *3* – мМКА 3F11

Fig. 3. Class specificity of mMCA:
1 – mMCA 5C3; *2* – mMCA 1E6; *3* – mMCA 3F11

3F11 составила соответственно: KD=1,414·10^{-7} M; KD=1,798·10^{-7} M и KD=2,991·10^{-7} M.

Определение способности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 ингибировать взаимодействие между ACE2 и RBD SARS-CoV-2 (варианты Wuhan-Hu-1 и омикрон подлинии BQ 1.1). SARS-CoV-2 использует трансмембранный S-гликопротеин для прикрепления и проникновения в клетки-мишени путем связывания с рецептором ACE2. Роль RBD в S-белке предполагает, что иммунизация этим доменом может индуцировать антитела, способные блокировать сайт связывания рецептора, расположенного между RBD и ACE2, таким образом нейтрализуя развитие вирусной инфекции [16].

В данном исследовании с помощью метода ИФА мы определили способность полученных мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 оказывать ингибирующую активность в отношении рекомбинантного белка RBD штамма Wuhan-Hu-1 и штамма омикрон подлинии BQ 1.1. На первом этапе RBD-нейтрализующие антитела взаимодействуют с RBD, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета. На втором этапе происходит взаимодействие RBD с рекомбинантным человеческим рецептором ACE2. В случае инфекции SARS-CoV-2 RBD-ACE2-нейтрализующая активность сывороток практически эквивалентна вируснейтрализующей активности их антител, поэтому данный метод может использоваться для оценки нейтрализующей активности антител к SARS-CoV-2.

Исследование нейтрализующей активности мМКА, взятых в максимальной концентрации (100 мкг/мл), показало, что мМКА 5С3 ингибировало взаимодействие ACE-2 и RBD штамма Wuhan-Hu-1 на 91 %; мМКА 1Е6 – на 71 %; а мМКА 3F11 – на 48 %.

Снижение концентрации мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 до 12,5 мкг/мл снижало и их нейтрализующую активность, которая составила 61, 30, 10 % соответственно. В минимальной концентрации 0,7 мкг/мл мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 нейтрализующая активность практически не выявлялась (рис. 4).

Поскольку S-белок SARS-CoV-2 является ключевым для вирусной инфекции, его рецептор-связующий домен стал основной мишенью для разработки терапевтических антител. Различные исследователи сообщают о большом количестве новых МКА, специфичных к белку S SARS-CoV-2, многие из которых связываются с RBD [6, 10]. В настоящее время в США и Европейском союзе одобрено минимум 14 таких препаратов и еще 27 находятся на разных стадиях клинических исследований [17]. За последние годы разработаны антитела, нейтрализующие SARS-CoV-2, для профилактического или терапевтического использования. Несколько мощных антител к SARS-CoV-2 показали определенную степень успеха в доклинических или клинических испытаниях, а Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) выдало разрешение на экстренное использование двух коктейлей нейтрализующих антител [18].

По причине возникающих мутаций в области RBD S-белка и появления новых штаммов SARS-CoV-2 многие сильнодействующие нейтрализующие МКА, включая все существующие в настоящее время коммерческие терапевтические МКА, оказались полностью или в значительной степени неэффективными. В экспериментах *in vitro* с использованием псевдовирусной системы и живых вирусов человеческие МКА, ранее разрешенные FDA: казиривимаб и имдевимаб (REGN10933 и REGN10987, Regeneron, США), бамланивимаб и этесевимаб (LY-CoV555 и LY-CoV016, Eli Lilly, США), вводимые в виде коктейля, а также регданвимаб (CT-P59, Celltrion, Южная Корея), – показали полную потерю нейтрализующей активности препаратов против варианта омикрон, и их использование было ограничено [19].

До недавнего времени сообщалось лишь о нескольких широко нейтрализующих антителах против варианта омикрон, включая LY-CoV1404 (бебтеловимаб), S2K146 и 87G7 [20]. Бебтеловимаб также больше не разрешен FDA к применению в США из-

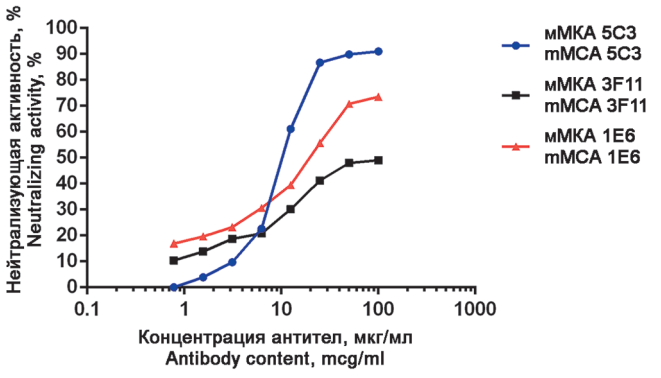

Рис. 4. Результаты определения ингибирующей активности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 с рекомбинантными белками ACE2 и RBD (Wuhan-Hu-1)

Fig. 4. Results of determining the inhibitory activity of mMCAs 5C3, 1E6, 3F11 with recombinant ACE2 and RBD proteins (Wuhan-Hu-1)

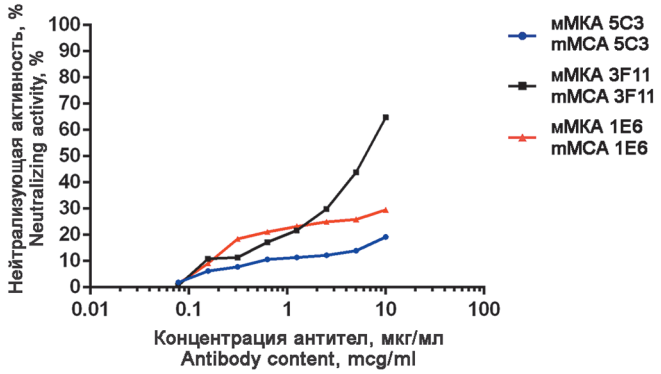

Рис. 5. Результаты определения ингибирующей активности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 с рекомбинантными белками ACE2 и RBD (BQ 1.1)

Fig. 5. Results of determining the inhibitory activity of mMCAs 5C3, 1E6, 3F11 with recombinant ACE2 and RBD proteins (BQ 1.1)

за отсутствия активности в отношении циркулирующих вариантов.

Существует острая необходимость в разработке антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, которые эффективны против нынешних и будущих вариантов.

В связи с этим полученные нами мМКА далее протестированы на способность нейтрализовать взаимодействие ACE-2 и рекомбинантного RBD штамма омикрон подлинии BQ 1.1. Нейтрализующая активность мМКА 5С3 и мМКА 1Е6 в максимальной концентрации 10 мкг/мл составила 19 и 27 % соответственно, мМКА 3F11 – 65 % (рис. 5).

Как показали результаты исследований, в экспериментах *in vitro* высокой нейтрализующей активностью в способности ингибировать взаимодействие белка ACE2 с белком RBD Wuhan-Hu-1 обладало мМКА 5С3, а наиболее эффективное ингибирование взаимодействия ACE2 и RBD штамма BQ 1.1 наблюдалось у мМКА 3F11.

Следовательно, полученные в данном исследовании мМКА представляют собой потенциальные кандидаты для создания терапевтических препаратов для борьбы с COVID-19. Поскольку применение мМКА в терапии ограничено их высокой иммуногенностью для человека, то с целью получения терапевтического МКА гибридома, синтезирующая мМКА, может быть использована для конструирования химерного или гуманизированного МКА.

Таким образом, полученные в работе мМКА могут потенциально представлять собой важные дополнительные инструменты для терапии COVID-19, а также способствовать пониманию функциональной структуры RBD SARS-CoV-2.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР 3.1.3.

Биоэтика. Все стадии исследования соответствовали законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены соответствующими комитетами.

Список литературы

1. Тришкин Д.В., Крюков Е.В., Салухов В.В., Котив Б.Н., Садовников П.С., Андрейчук Ю.В., Чугунов А.А. Особенности формирования и продолжительность сохранения нейтрализующих антител к S-белку SARS-CoV-2 у лиц, перенесших новую коронавирусную инфекцию (COVID-19) легкого или бессимптомного течения. *Вестник РАМН*. 2021; 76(4):361–7. DOI: 10.15690/vramn1582.

2. Балахонов С.В., Дубровина В.И., Чеснокова М.В., Войткова В.В., Пятидесятникова А.Б., Брюхова Д.Д., Киселева Н.О., Корытов К.М., Кузнецова Т.Г., Маркевич Ж.В. Изучение гуморального иммунного ответа при лёгкой и бессимптомной формах проявления COVID-19. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020; 5(5):26–30. DOI: 10.29413/ABS.2020-5.5.3.

3. Zhou Y., Zhi H., Teng Y. The outbreak of SARS-CoV-2 Omicron lineages, immune escape, and vaccine effectivity. *J. Med. Virol.* 2023; 95(1):e28138. DOI: 10.1002/jmv.28138.

4. Faria N.R., Mellan T.A., Whittaker C., Claro I.M., Candido D.D.S., Mishra S., Crispim M.A.E., Sales F.C.S., Hawryluk I., McCrone J.T., Hulswit R.J.G., Franco L.A.M., Ramundo M.S., de Jesus J.G, Andrade P.S., Coletti T.M., Ferreira G.M., Silva C.A.M., Manuli E.R., Pereira R.H.M., Peixoto P.S., Kraemer M.U.G., Gaburo N. Jr, Camilo C.D.C., Hoeltgebaum H., Souza W.M., Rocha E.C., de Souza L.M., de Pinho M.C., Araujo L.J.T., Malta F.S.V., de Lima A.B., Silva J.D.P., Zauli D.A.G., Ferreira A.C.S., Schnekenberg R.P., Laydon D.J., Walker P.G.T., Schlüter H.M., Dos Santos A.L.P., Vidal M.S., Del Caro V.S., Filho R.M.F., Dos Santos H.M., Aguiar R.S., Proença-Modena J.L., Nelson B., Hay J.A., Monod M., Miscouridou X., Coupland H., Sonabend R., Vollmer M., Gandy A., Prete C.A. Jr, Nascimento V.H., Suchard M.A., Bowden T.A., Pond S.L.K., Wu C.H., Ratmann O., Ferguson N.M., Dye C., Loman N.J., Lemey P., Rambaut A., Fraiji N.A., Carvalho M.D.P.S.S., Pybus O.G., Flaxman S., Bhatt S., Sabino E.C. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 2021; 372(6544):815–21. DOI: 10.1126/science.abh2644.

5. Singh J., Rahman S.A., Ehtesham N.Z., Hira S., Hasnain S.E. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat. Med.* 2021; 27(7):1131–3. DOI: 10.1038/s41591-021-01397-4.

6. Hwang Y.C., Lu R.M., Su S.C., Chiang P.Y., Ko S.H., Ke F.Y., Liang K.H., Hsieh T.Y., Wu H.C. Monoclonal antibodies for COVID-19 therapy and SARS-CoV-2 detection. *J. Biomed. Sci.* 2022; 29(1):1. DOI: 10.1186/s12929-021-00784-w.

7. Kumar S., Chandele A., Sharma A. Current status of therapeutic monoclonal antibodies against SARS-CoV-2. *PLoS Pathog.* 2021; 17(9):e1009885. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009885.

8. Kim C., Ryu D.K., Lee J., Kim Y.I., Seo J.M., Kim Y.G., Jeong J.H., Kim M., Kim J.I., Kim P., Bae J.S., Shim E.Y., Lee M.S., Kim M.S., Noh H., Park G.S., Park J.S., Son D., An Y., Lee J.N., Kwon K.S., Lee J.Y., Lee H., Yang J.S., Kim K.C., Kim S.S., Woo H.M., Kim J.W., Park M.S., Yu K.M., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Jeong S.T., Yu C.H., Song Y., Gu S.H., Oh H., Koo B.S., Hong J.J., Ryu C.M., Park W.B., Oh M.D., Choi Y.K., Lee S.Y. A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. *Nat. Commun.* 2021; 12(1):288. DOI: 10.1038/s41467-020-20602-5.

9. Баклаушев В.П., Самойлова Е.М., Кузнецова С.М., Ермолаева Е.В., Юсубалиева Г.М., Кальсин В.А., Троицкий А.В. Технологии создания вируснейтрализующих антител человека на примере SARS-CoV-2. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2022; 24(4):5–13. DOI: 10.47183/mes.2022.049.

10. Taylor P.C., Adams A.C., Hufford M.M., de la Torre I., Winthrop K., Gottlieb R.L. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21(6):382–93. DOI: 10.1038/s41577-021-00542-x.

11. Huang Y., Yang C., Xu X.F., Xu W., Liu S.W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin.* 2020; 41(9):1141–9. DOI: 10.1038/s41401-020-0485-4.

12. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell*. 2018; 9(1):15–32. DOI: 10.1007/s13238-017-0408-4.

13. Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Марьин М.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Оценка эффективности различных адъювантов при получении мышиных моноклональных антител к рецептор-связывающему домену S-белка SARS-CoV-2. *Иммунология*. 2023; 44(4):481–90. DOI: 10.33029/1816-2134-2023-44-4-481-490.

14. 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. Оптимизация условий электрослияния для получения гибридом, синтезирующих человеческие

моноклональные антитела. *Биотехнология*. 2021; 37(2):65–75. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-2-65-75.

15. Куклина Г.В., Ипатов С.С., Горшков А.С., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кузнецовский А.В., Туманов А.С., Дармов И.В. Получение и характеристика гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам коронавируса SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 1:105–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-105-110.

16. Mariotti S., Capocefalo A., Chiantore M.V., Iacobino A., Teloni R., De Angelis M.L., Gallinaro A., Pirillo M.F., Borghi M., Canitano A., Michelini Z., Baggieri M., Marchi A., Bucci P., McKay P.F., Acchioni C., Sandini S., Sgarbanti M., Tosini F., Di Virgilio A., Venturi G., Marino F., Esposito V., Di Bonito P., Magurano F., Cara A., Negri D., Nisini R. Isolation and characterization of mouse monoclonal antibodies that neutralize SARS-CoV-2 and its variants of concern Alpha, Beta, Gamma and Delta by binding conformational epitopes of glycosylated RBD with high potency. *Front. Immunol*. 2021; 12:750386. DOI: 10.3389/fimmu.2021.750386.

17. Володина Е.В., Фролова Н.Ф., Лысенко М.А., Ким И.Г., Ушакова А.И., Виноградов В.Е., Усатюк С.С., Никитина А.М., Маркина У.А., Червинко В.И., Крюков Е.В., Зубкин М.Л. Применение нейтрализующих моноклональных антител при SARS-CoV-2-инфекции у больных, получающих лечение гемодиализом. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2022; 11(4):38–46. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-4-38-46.

18. Li D., Sempowski G.D., Saunders K.O., Acharya P., Haynes B.F. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies for COVID-19 prevention and treatment. *Annu. Rev. Med*. 2022; 73:1–16. DOI: 10.1146/annurev-med-042420-113838.

19. Zhou D., Ren J., Fry E.E., Stuart D.I. Broadly neutralizing antibodies against COVID-19. *Curr. Opin. Virol*. 2023; 61:101332. DOI: 10.1016/j.coviro.2023.101332.

20. Meng L., Zha J., Zhou B., Cao L., Jiang C., Zhu Y., Li T., Lu L., Zhang J., Yang H., Feng J., Gu Z., Tang H., Jiang L., Li D., Lavillette D., Zhang X. A Spike-destructing human antibody effectively neutralizes Omicron-included SARS-CoV-2 variants with therapeutic efficacy. *PLoS Pathog*. 2023; 19(1):e1011085. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011085.

References

1. Trishkin D.V., Kryukov E.V., Salukhov V.V., Kotiv B.N., Sadovnikov P.S., Andreychuk Yu.V., Chugunov A.A. [A prospective multicenter randomized study: state of humoral immunity after a new coronavirus infection (COVID-19) of a mild or asymptomatic course]. *Vestnik Rossiskoj Akademii Meditsinskikh Nauk [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2021; 76(4):361–7. DOI: 10.15690/vramn1582.

2. Balakhonov S.V., Dubrovina V.I., Chesnokova M.V., Voitkova V.V., Pyatidesyatnikova A.B., Bryukhova D.D., Kiseleva N.O., Korytov K.M., Kuznetsova T.G., Markevich Zh.V. [Studying humoral immune response at mild and asymptomatic COVID-19 forms]. *Acta Biomedica Scientifica.* 2020; 5(5):26–30. DOI: 10.29413/ABS.2020-5.5.3.

3. Zhou Y., Zhi H., Teng Y. The outbreak of SARS-CoV-2 Omicron lineages, immune escape, and vaccine effectivity. *J. Med. Virol.* 2023; 95(1):e28138. DOI: 10.1002/jmv.28138.

4. Faria N.R., Mellan T.A., Whittaker C., Claro I.M., Candido D.D.S., Mishra S., Crispim M.A.E., Sales F.C.S., Hawryluk I., McCrone J.T., Hulswit R.J.G., Franco L.A.M., Ramundo M.S., de Jesus J.G, Andrade P.S., Coletti T.M., Ferreira G.M., Silva C.A.M., Manuli E.R., Pereira R.H.M., Peixoto P.S., Kraemer M.U.G., Gaburo N. Jr, Camilo C.D.C., Hoeltgebaum H., Souza W.M., Rocha E.C., de Souza L.M., de Pinho M.C., Araujo L.J.T., Malta F.S.V., de Lima A.B., Silva J.D.P., Zauli D.A.G., Ferreira A.C.S., Schnekenberg R.P., Laydon D.J., Walker P.G.T., Schlüter H.M., Dos Santos A.L.P., Vidal M.S., Del Caro V.S., Filho R.M.F., Dos Santos H.M., Aguiar R.S., Proença-Modena J.L., Nelson B., Hay J.A., Monod M., Miscouridou X., Coupland H., Sonabend R., Vollmer M., Gandy A., Prete C.A. Jr, Nascimento V.H., Suchard M.A., Bowden T.A., Pond S.L.K., Wu C.H., Ratmann O., Ferguson N.M., Dye C., Loman N.J., Lemey P., Rambaut A., Fraiji N.A., Carvalho M.D.P.S.S., Pybus O.G., Flaxman S., Bhatt S., Sabino E.C. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science.* 2021; 372(6544):815–21. DOI: 10.1126/science.abh2644.

5. Singh J., Rahman S.A., Ehtesham N.Z., Hira S., Hasnain S.E. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat. Med*. 2021; 27(7):1131–3. DOI: 10.1038/s41591-021-01397-4.

6. Hwang Y.C., Lu R.M., Su S.C., Chiang P.Y., Ko S.H., Ke F.Y., Liang K.H., Hsieh T.Y., Wu H.C. Monoclonal antibodies for COVID-19 therapy and SARS-CoV-2 detection. *J. Biomed. Sci*. 2022; 29(1):1. DOI: 10.1186/s12929-021-00784-w.

7. Kumar S., Chandele A., Sharma A. Current status of therapeutic monoclonal antibodies against SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*. 2021; 17(9):e1009885. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009885.

8. Kim C., Ryu D.K., Lee J., Kim Y.I., Seo J.M., Kim Y.G., Jeong J.H., Kim M., Kim J.I., Kim P., Bae J.S., Shim E.Y., Lee M.S., Kim M.S., Noh H., Park G.S., Park J.S., Son D., An Y., Lee J.N., Kwon K.S., Lee J.Y., Lee H., Yang J.S., Kim K.C., Kim S.S., Woo H.M., Kim J.W., Park M.S., Yu K.M., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Jeong S.T., Yu C.H., Song Y., Gu S.H., Oh H., Koo B.S., Hong J.J., Ryu C.M., Park W.B., Oh M.D., Choi Y.K., Lee S.Y. A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein. *Nat. Commun*. 2021; 12(1):288. DOI: 10.1038/s41467-020-20602-5.

9. Baklaushev V.P., Samoilova E.M., Kuznetsova S.M., Ermolaeva E.V., Yusubalieva G.M., Kalsin V.A., Lipatova A.V., Troitsky A.V. [Neutralizing antibody creation technologies: case of SARS-CoV-2]. *Meditsina Ekstremal'nykh Situatsij [Extreme Medicine]*. 2022; 24(4):5–13. DOI: 10.47183/mes.2022.049.

10. Taylor P.C., Adams A.C., Hufford M.M., de la Torre I., Winthrop K., Gottlieb R.L. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nat. Rev. Immunol*. 2021; 21(6):382–93. DOI: 10.1038/s41577-021-00542-x.

11. Huang Y., Yang C., Xu X.F., Xu W., Liu S.W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol. Sin*. 2020; 41(9):1141–9. DOI: 10.1038/s41401-020-0485-4.

12. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell*. 2018; 9(1):15–32. DOI: 10.1007/s13238-017-0408-4.

13. Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Marin M.A., Kartseva A.S., Silkina M.V., Zeninskaya N.A., Shemyakin I.G., Firstova V.V. [Evaluation of the efficacy of different adjuvants in producing murine monoclonal antibodies to the receptor-binding domain of the S-protein of SARS-CoV-2]. *Immunologiya [Immunology]*. 2023; 44(4):481–90. DOI: 10.33029/1816-2134-2023-44-4-481-90.

14. Silkina M.V., Kartseva A.S., Ryabko A.K., Mar'in M.A., Romanenko Ya.O., Kalmantaeva O.V., Khlyntseva A.E., Shemyakin I.G., Dyatlov I.A., Firstova V.V. [Optimization of electrofusion conditions for obtaining hybridomas synthesizing human monoclonal antibodies]. *Biotekhnologiya [Biotechnology]*. 2021; 37(2):65–75. DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-2-65-75.

15. Kuklina G.V., Ipatov S.S., Gorshkov A.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kuznetsovsky A.V., Tumanov A.S., Darmov I.V. [Obtaining and characterization of hybridomas producing monoclonal antibodies against coronavirus SARS-CoV-2]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (1):105–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-105-110.

16. Mariotti S., Capocefalo A., Chiantore M.V., Iacobino A., Teloni R., De Angelis M.L., Gallinaro A., Pirillo M.F., Borghi M., Canitano A., Michelini Z., Baggieri M., Marchi A., Bucci P., McKay P.F., Acchioni C., Sandini S., Sgarbanti M., Tosini F., Di Virgilio A., Venturi G., Marino F., Esposito V., Di Bonito P., Magurano F., Cara A., Negri D., Nisini R. Isolation and characterization of mouse monoclonal antibodies that neutralize SARS-CoV-2 and its variants of concern Alpha, Beta, Gamma and Delta by binding conformational epitopes of glycosylated RBD with high potency. *Front. Immunol*. 2021; 12:750386. DOI: 10.3389/fimmu.2021.750386.

17. Volodina E.V., Frolova N.F., Lysenko M.A., Kim I.G., Ushakova A.I., Vinogadov V.E., Usatiuk S.S., Nikitina A.M., Markina U.A., Chervinko V.I., Kryukov E.V., Zubkin M.L. [The use of neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 in hemodialysis patient]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2022; 11(4):38–46. DOI: 10.33029/2305-3496-2022-11-4-38-46.

18. Li D., Sempowski G.D., Saunders K.O., Acharya P., Haynes B.F. SARS-CoV-2 neutralizing antibodies for COVID-19 prevention and treatment. *Annu. Rev. Med*. 2022; 73:1–16. DOI: 10.1146/annurev-med-042420-113838.

19. Zhou D., Ren J., Fry E.E., Stuart D.I. Broadly neutralizing antibodies against COVID-19. *Curr. Opin. Virol*. 2023; 61:101332. DOI: 10.1016/j.coviro.2023.101332.

20. Meng L., Zha J., Zhou B., Cao L., Jiang C., Zhu Y., Li T., Lu L., Zhang J., Yang H., Feng J., Gu Z., Tang H., Jiang L., Li D., Lavillette D., Zhang X. A Spike-destructing human antibody effectively neutralizes Omicron-included SARS-CoV-2 variants with therapeutic efficacy. *PLoS Pathog*. 2023; 19(1):e1011085. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011085.

Authors:

Ivashchenko T.A., Romanenko Ya.O., Kartseva A.S., Silkina M.V., Mar'in M.A., Khlyntseva A.E., Zeninskaya N.A., Shemyakin I.G., Firstova V.V. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, urban district Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obvolensk.org.

Об авторах:

Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Хлынцева А.Е., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск. E-mail: info@obvolensk.org.