

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСА РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА SARS-CoV-2 И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО НАНОАНТИТЕЛА

© 2023 г. К. М. Бойко^{1,*}, Л. А. Варфоломеева¹, Н. А. Егоркин¹, М. Е. Миняев², И. А. Алексеева³,
И. А. Фаворская³, Е. И. Рябова³, В. В. Прокофьев³, И. Б. Есмагамбетов³, Д. В. Щепляков³,
Д. Ю. Логунов³, А. Л. Гинцбург³, В. О. Попов¹, Н. Н. Случанко^{1,3,**}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, Россия

²Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

³НИЦЭМ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

*E-mail: kmb@inbi.ras.ru

**E-mail: nikolai.sluchanko@mail.ru

Поступила в редакцию 13.06.2023 г.

После доработки 13.06.2023 г.

Принята к публикации 27.06.2023 г.

Коронавирус SARS-CoV-2 стал причиной глобальной пандемии COVID-19, унесшей миллионы жизней по всему миру. Одним из подходов к терапии тяжелых форм этого заболевания является использование препаратов вируснейтрализующих антител к рецепторсвязывающему домену (RBD) спайкового белка (S) вируса. Детальная структурная информация о конкретных эпитопах, узнаваемых такими вируснейтрализующими антителами, является важным аспектом усовершенствования существующих антител с целью расширения спектра узнаваемых вирусных штаммов. Получен стехиометрический комплекс вируснейтрализующего однодоменного антитела P2C5 и гликозилированной формы RBD S-белка SARS-CoV-2. Несмотря на большое количество условий, при которых наблюдается рост кристаллов комплекса, последние не дифрагируют предположительно ввиду гетерогенности, связанной с гликозилированием RBD. С целью повышения качества кристаллов в бактериальной системе экспрессии получена дегликозилаза PNGase F и проведено дегликозилирование RBD. Несмотря на сниженную растворимость дегликозилированной формы RBD, она сохраняет способность связываться с нанокристаллом P2C5, что приводит к формированию прочного гетеродимерного комплекса при гель-фильтрации. Получены кристаллы такого комплекса, дифрагирующие на лабораторном и синхротронном источниках до сходного разрешения ~4 Å. Установлены пространственная группа симметрии, параметры кристаллической ячейки и ее белковый состав.

DOI: 10.31857/S0023476123600830, EDN: XOAIEU

ВВЕДЕНИЕ

Пандемии и сезонные эпидемии, связанные с вирусными заболеваниями, являются причиной серьезных негативных социально-экономических последствий. В настоящее время нейтрализующие антитела успешно применяются для терапии ряда инфекционных заболеваний [1–4]. В то же время продолжающиеся эпидемии вирусных инфекций способствуют появлению новых вариантов вируса, которые способны избегать как иммунитета, так и действия лекарственных препаратов. Некоторые наиболее эффективные клоны антител против одних вариантов вируса неизбежно теряют свое действие по отношению к новым штаммовым вариантам за счет накопления мутаций в последних. Наличие детальной

структурной информации о конкретных эпитопах, узнаваемых вируснейтрализующими антителами, позволит усовершенствовать имеющиеся антитела с помощью методов белковой инженерии и расширит эффективность стратегий борьбы с соответствующими инфекционными заболеваниями.

Инфекция COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, в период с 2019 до середины 2023 г. унесла почти 7 млн жизней по всему миру (<https://covid19.who.int>). С начала пандемии во всем мире проводится направленное получение моноклональных антител, обладающих высокой вируснейтрализующей активностью, для терапии тяжелого течения заболевания COVID-19 [1, 5]. В качестве основной мишени для таких антител

используется поверхностный гликопротеин (S-белок) вируса SARS-CoV-2, поскольку моноклональные антитела, специфично взаимодействующие с эпитопами S-белка, могут блокировать его взаимодействие с клеточным рецептором ACE-2 и тем самым препятствовать проникновению вируса в клетки человека [6].

В ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ был разработан препарат на основе нейтрализующих однодоменных антител (клон P2C5), который продемонстрировал эффективность на модели летальной инфекции ACE-2 трансгенных мышей различными вариантами вируса SARS-CoV-2, в том числе против актуальных вариантов Omicron BA.1, BA.2, BA.5. В результате изучения вируснейтрализующей активности препарата *in vitro* с использованием нативного вируса SARS-CoV-2 вариантов Omicron BA.1, BA.2, BA.5 была показана минимальная эффективная концентрация препарата менее 1.2 мкг/мл [7, 8].

В настоящей работе получены комплексы вируснейтрализующего антитела P2C5 с гликозилированной и дегликозилированной формами рецепторсвязывающего домена (RBD) вируса SARS-CoV-2 и оптимизированы условия получения кристаллов одного из комплексов, дифрагирующих до 3.7 Å. Установлены пространственная группа симметрии и параметры кристаллической ячейки. Согласно оценке коэффициента Мэтьюса и с учетом известной стехиометрии комплекса предполагается наличие пяти гетеродимеров RBD-P2C5 в независимой части элементарной ячейки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение комплекса RBD–наноантитело. Ген белка RBD изолята SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (инвентарный номер Генбанка MN908947, от 319 до 545 аминокислотного остатка) синтезирован (Евроген, Россия) и клонирован в вектор для экспрессии pCEP4 в клетках млекопитающих (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве сигнального пептида, обеспечивающего секрецию белка, использовали последовательность из гена щелочной фосфатазы SEAP. Для очистки белка использовали His-метку на С-концевом участке последовательности гена RBD. Полученный рекомбинантный вектор трансфицировали в клетки CHO-S, очистку белка проводили из культурального супернатанта через 10 дней после трансфекции. Рекомбинантный белок RBD очищали методом металл-хелатной аффинной хроматографии, а также гель-фильтрации [9]. Экспрессию и чистоту белка подтверждали с помощью SDS-PAGE. Однодоменное антитело P2C5 (VHH фрагмент) [7], несущее С-концевой гексагистидиновый таг, было получено в клетках Rosetta (DE3) путем экстракции белков периплазмы и дальнейшей

очистки на Ni-сефарозе и гель-фильтрации. Комплекс наноантитела P2C5 и RBD получали путем титрования RBD увеличивающимися количествами P2C5 и анализа полученного комплекса, эмпирически подбирая соотношение, при котором образовывался стехиометрически насыщенный комплекс и детектировался избыток антитела с помощью аналитической гель-фильтрации на колонке Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare) при скорости потока 0.45 мл/мин на хроматографической системе Prostar 335 (Varian, Австралия), регистрируя профили элюции по поглощению при 280 нм.

Получение дегликозилазы PNGase F в бактериальной системе экспрессии. Кодированная ДНК дегликозилазы Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase F (PNGase F) из *Flavobacterium meningosepticum* была синтезирована в Клонинг Фасилити (Россия, <https://cloning.tech>) и клонирована в вектор pEXPR_001 (устойчивость к ампициллину, T7-промотор) таким образом, что на N-конце конструкции располагался сигнальный пептид OmpA3 для направления в периплазму (MKKTAIAIAVALAGFATVAQA—), а на С-конце — гексагистидиновый таг, отщепляемый TEV-протеазой (последовательность —ENLYFQ/GSDP-His6). Корректность последовательности была подтверждена ДНК-секвенированием по Сэнгеру. Плазмида была использована для трансформации химически компетентных клеток *E. coli* штамма BL21(DE3). Оптимизированные условия экспрессии белка включали в себя индукцию добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом до конечной концентрации 0.3 мМ и культивирование в течение ночи при 19°C. Экстракцию белка проводили с помощью ультразвука в лизис-буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола. Очистка фермента включала в себя две стадии металлохелатной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе, между которыми гис-таг был отщеплен при диализе под действием TEV-протеазы. Полученный электрофоретически гомогенный препарат PNGase F (0.5 мг/мл) с кажущейся молекулярной массой 36 кДа был переведен в буфер хранения, содержащий 10 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 75 мМ NaCl, 1.5 мМ меркаптоэтанол, 0.5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты. Для измерения концентрации PNGase F спектрофотометрическим методом брали массовый коэффициент экстинкции, равный $1.91 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (фермент с тагом) или $1.97 \text{ (мг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$ (фермент без тага).

Реакция дегликозилирования проходила в гель-фильтрационном буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 150 мМ NaCl, 3 мМ азида натрия) при 37°C.

Кристаллизация комплекса RBD–антитела P2C5. Скрининг условий кристаллизации комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и гликозилированной и дегликозилированной форм рецепторсвязывающего домена S-белка SARS-CoV-2 проводили с использованием роботизированной системы Огук 4 (Douglas Instruments, UK) и кристаллизационных китов Hampton Research (USA). Стержнеобразные кристаллы с длиной наибольшей грани ~100 мкм достигали максимального размера за 7 дней и росли в ряде условий кита PEG/Ion HT (Hampton Research, USA). Наилучшей дифракцией обладали кристаллы, выросшие в следующих условиях: 8% v/v Tacsimate, pH 6.0, 20% w/v PEG3350. Во избежание разрушения кристаллов непосредственно перед рентгеноструктурным экспериментом их на несколько секунд обмакивали в криораствор, содержащий помимо противораствора 10% этиленгликоля, после чего замораживали в парах жидкого азота.

Рентгеноструктурный анализ. Тестирование выросших кристаллов и сбор дифракционных данных проводили при температуре 100 К на рентгеновском дифрактометре Rigaku XtaLAB Synergy-S (Rigaku, США), а также на станции XRD2 синхротронного источника Elettra (Италия). В первом случае дифракционная картина фиксировалась детектором HyPix-3000. Обработку данных проводили при помощи программы CrysAlisPro (CrysAlisPRO, Oxford Diffraction/Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, England), а шкалирование – в Aimless [10] (табл. 1). В случае данных, собранных на синхротронном источнике, дифракционная картина фиксировалась детектором Dectris Pilatus 6М, а обработку и шкалирование проводили с помощью программ Dials [11] и Aimless соответственно (табл. 1). Оценку содержания белка в независимой части элементарной ячейки проводили в программном пакете CCP4 [12].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Получение комплекса наноантитела P2C5 с гликозилированной формой RBD. Выбранные методики позволили получить гидродинамически гомогенные препараты наноантитела P2C5 и RBD, которые элюировались при аналитической гелефильтрации в виде одиночных симметричных пиков и не содержали фракции агрегатов (рис. 1). Положение пиков на профиле элюции совпадало с ожидаемым для более крупных частиц RBD (масса, рассчитанная по последовательности, равна 27 кДа) по сравнению с P2C5 (16 кДа), поэтому для получения комплекса этих белков фиксированную концентрацию RBD титровали увеличивающимися количествами P2C5 так, чтобы избыток антитела элюировался в виде пика с наи-

Таблица 1. Условия кристаллизации комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и дегликозилированной формы рецепторсвязывающего домена SARS-CoV-2

Условие	Состав противораствора
1	8% v/v Tacsimate, pH 6.0, 20% PEG 3350
2	0.1 М ацетат натрия, pH 4.6, 2.0 М формиат натрия
3	0.1 М HEPES, pH 7.5, 0.8 М калия-натрия тетрагидрат тартрата
4	10% PEG 1000, 10% PEG 8000
5	0.1 М MES моногидрат, pH 6.5, 1.6 М гептагидрат сульфата магния
6	0.1 М MES моногидрат, pH 6.5, 12% PEG 20000
7	0.1 М HEPES, pH 7.5, 10% PEG 8000, 8% этиленгликоль
8	0.1 М БИЦИН, pH 9.0, 2% 1,4-диоксан, 10% PEG 20000
9	0.1 М HEPES, pH 7.5. 10% v/v 2-пропанол, 20% PEG 4000

Примечание. Нумерация условий соответствует нумерации на рис. 5а Условие, в котором росли дифрагирующие кристаллы, отмечено на рис. 5а белым контуром.

меньшим перекрыванием с пиком комплекса (рис. 1). Так было подобрано соотношение антитела и RBD, приводящее к образованию насыщенного, стехиометрического гетеродимерного комплекса, который далее очищали при помощи препаративной геле-фильтрации и подвергали кристаллизационному скринингу. Полученный комплекс хорошо концентрировался и давал кристаллы в большом числе различных условий (данные не приведены). Кристаллы, полученные на этом этапе, были протестированы на лабораторном источнике с различным сочетанием криопротекторов (глицерин, этиленгликоль, PEG400 и паратовое масло) и показали полное отсутствие дифракции, что можно было объяснить наличием в кристаллах неупорядоченных контактов, формируемых остатками сахаров.

Получение PNGase F и ее применение для дегликозирования RBD. Поскольку получаемый из эукариотических клеток RBD является гликопротеином, предположили, что гликозилирование мешает образованию упорядоченной кристаллической решетки, как это показано для некоторых других белков [13]. Для дегликозирования получаемого RBD была клонирована и получена в бактериальной системе экспрессии дегликозилаза PNGase F, несущая на C-конце отщепляемый гис-таг. Электрофоретически гомогенный фермент был получен при проведении двух повторов экстракции и вычитающей металлохелатной хроматографии (рис. 2). От-

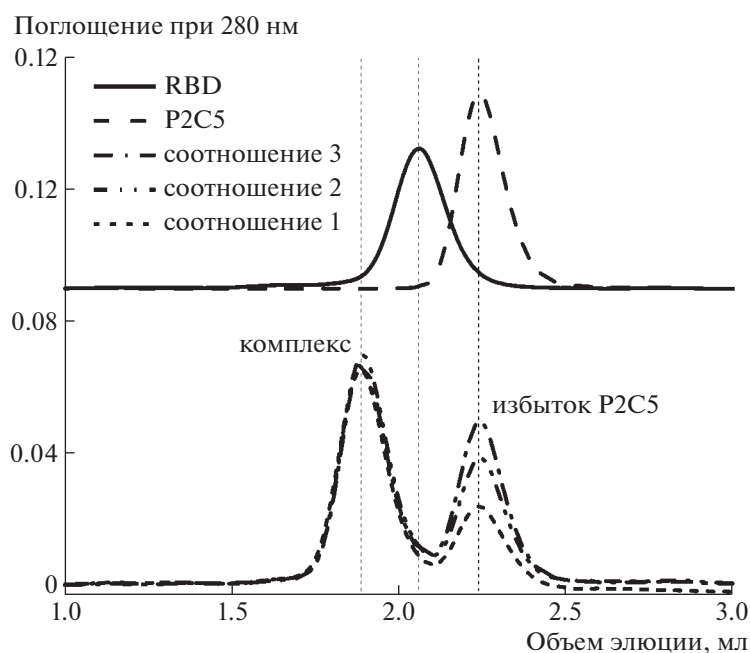


Рис. 1. Наноантитело P2C5 формирует с RBD спайк-белка SARS-CoV-2 прочный стехиометрический комплекс. Приведены профили элюции, полученные на колонке Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare) при нанесении свободного P2C5, свободного RBD или его смесей с избытком P2C5 в трех разных соотношениях. Скорость потока — 0.45 мл/мин. Пунктирными линиями показаны положения на профиле элюции для свободного антитела, RBD, а также их комплекса.

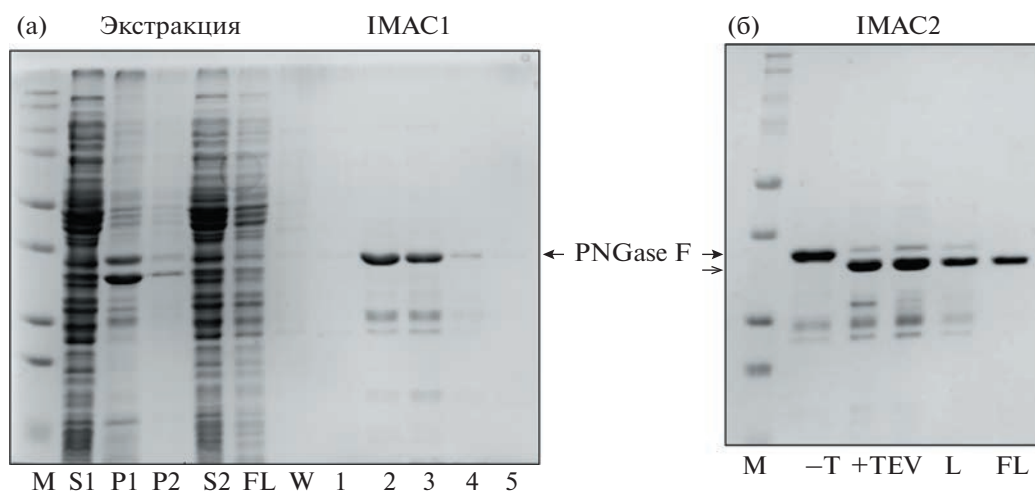


Рис. 2. Получение PNGase F в бактериях: а — экстракция (S1 и P1 — супернатант и осадок после первой ультразвуковой обработки и центрифугирования, S2 и P2 — супернатант и осадок после второй ультразвуковой обработки и центрифугирования) и первая металлохелатная хроматография (IMAC1: S2 — нанесение, FL — проскок, W — промывка, 1–5 — фракции элюции имидазолом); б — вторая металлохелатная хроматография (IMAC2) после отщепления гис-тага TEV-протеазой. –T — до добавления TEV, +TEV — после добавления, L — нанесение, FL — фракция целевого белка, не связавшегося с Ni-NTA-сефарозой. М — маркеры молекулярных масс 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 кДа (нижние маркеры вышли из геля). Закрытая стрелка показывает подвижность PNGase F с тагом, открытая — без тага.

щепление гис-тага под действием высокоспецифичной TEV-протеазы привело к заметному сдвигу электрофоретической подвижности и существенно увеличило чистоту препарата на стадии второй

металлоаффинной хроматографии (рис. 2б). После смены буфера был проведен анализ активности PNGase F по дегликозилированию RBD (рис. 3). Удалось подобрать соотношение субстрат–фер-

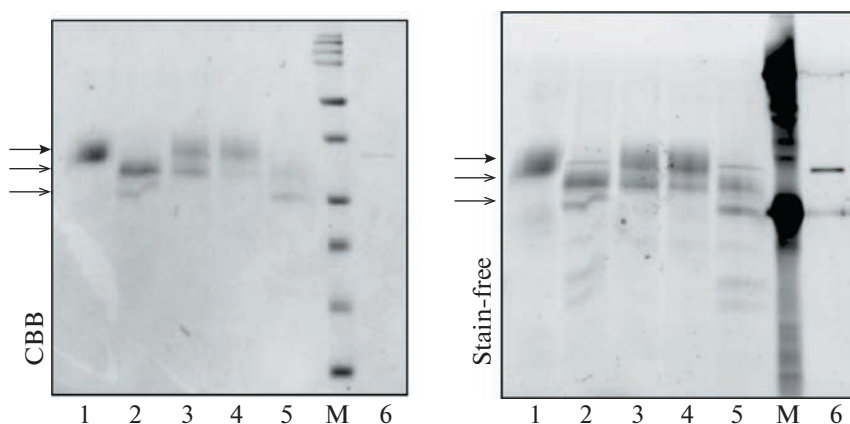


Рис. 3. Дегликозилирование RBD под действием PNGase F. Результаты дегликозилирования RBD *in vitro* анализировали с помощью гель-электрофореза по Лэмбли с визуализацией с помощью окрашивания Кумасси G250 (CBB, слева) или по технологии Stain-free® (Bio-Rad) (справа). Схема нанесения: исходный нативный RBD (1) или нативный RBD, проинкубированный с PNGase F в соотношении 100 : 1 (2), 500 : 1 (3), 1000:1 (4). В контроле дегликозилировали RBD, предварительно прогретый при 95°C, в соотношении с PNGase F 100:1 (5). М — маркеры молекулярных масс 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 кДа. На дорожке 6 нанесена PNGase F в качестве дополнительного контроля. Закрытой стрелкой показано положение исходного RBD, а открытыми стрелками показано положение его дегликозилированных форм.

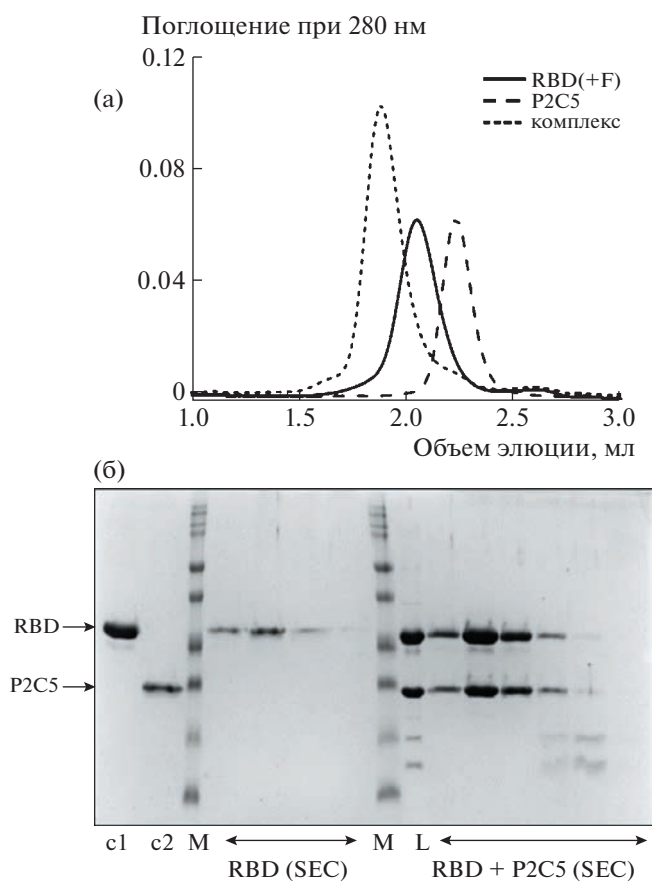


Рис. 4. Получение гетеродимерного комплекса наноантитела P2C5 с дегликозилированной формой RBD: а — профили аналитической гель-фильтрации на колонке Superdex 200 Increase 5/150 (GE Healthcare), показывающие образование прочного комплекса (короткая штриховая линия) между антителом (длинная штриховая линия) и RBD (сплошная линия). Скорость потока — 0.45 мл/мин; б — электрофоретический анализ фракций, полученных при полупрепаративной гель-фильтрации свободного RBD или его комплекса с P2C5 на колонке Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare) при скорости потока 1 мл/мин (объем фракций — по 1 мл). На контрольные дорожки c1 и c2 нанесены свободные RBD и P2C5 соответственно. Подвижность RBD и P2C5 в геле показана стрелками.

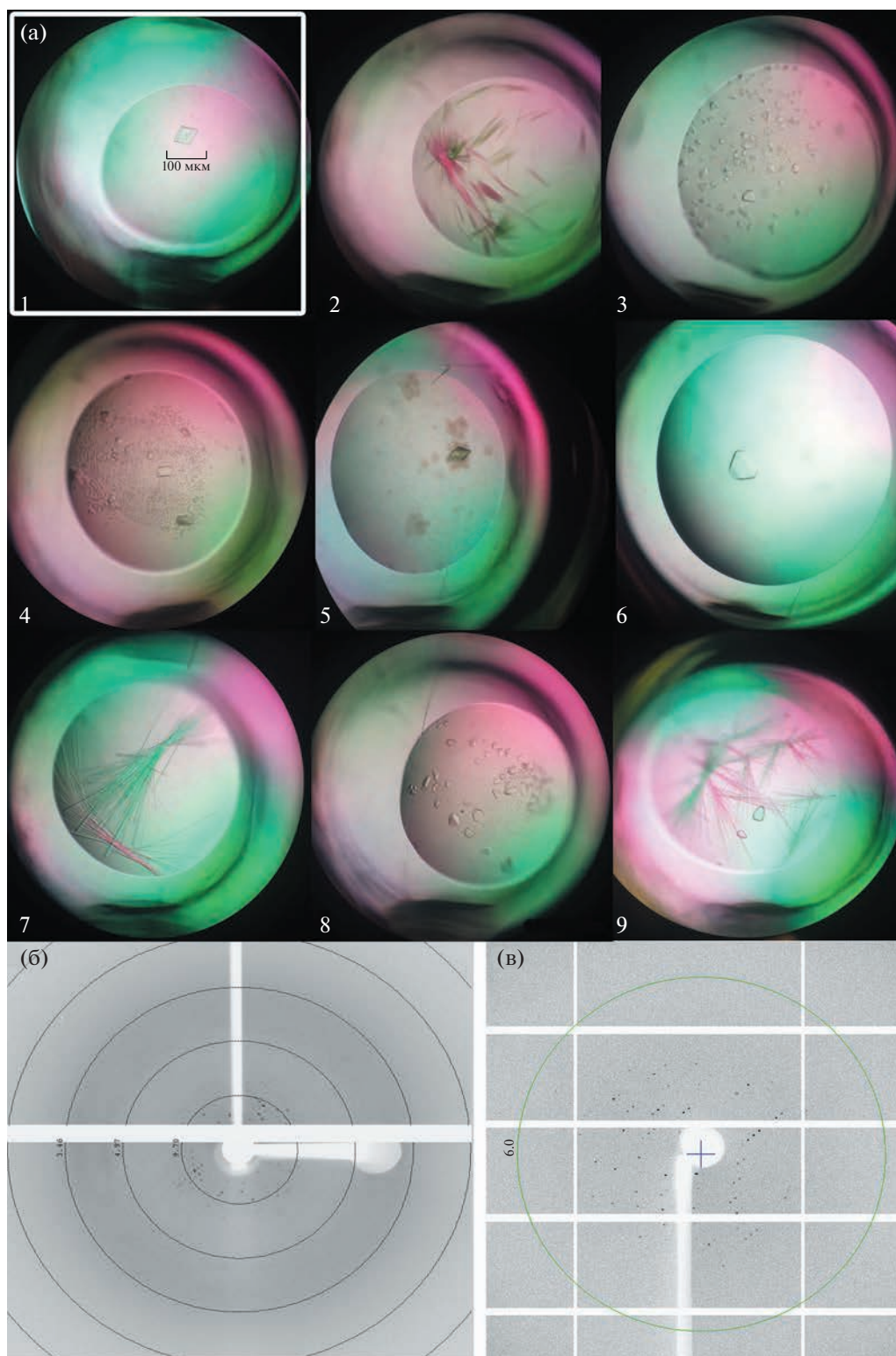


Рис. 5. Кристаллы (а) и дифракционные картины для кристаллов комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и дегликозилированного рецепторсвязывающего домена S-белка SARS-CoV-2, полученные на лабораторном (б) и синхротронном источнике (в). Цифрами отмечены кристаллизационные условия из табл. 1. Белым контуром отмечено условие, в котором росли дифрагирующие кристаллы, использованные для сбора данных. На панелях (б) и (в) окружностями ограничены пределы разрешения.

Таблица 2. Кристаллографические данные и параметры съемки кристаллов комплекса вируснейтрализующего антитела P2C5 и дегликозилированной формы рецепторсвязывающего домена SARS-CoV-2

	Лабораторный источник	Станция XRD2 Elettra
Пр. гр.	$I222/I2_12_1$	$I222/I2_12_1$
$a, b, c, \text{\AA}$	119.78, 175.56, 279.27	122.73, 171.38, 280.78
$\alpha = \beta = \gamma, \text{град}$	90.00	90.00
$T, \text{К}$	100	100
$\lambda, \text{\AA}$	1.54	1.0
Разрешение, $\text{\AA}$	23.29–3.70 (3.90–3.70)*	146.29–4.10 (4.43–4.10)
Число независимых рефлексов	31 653 (4623)	23 640 (4771)
Полнота набора, %	99.5 (100)	100 (100)
$I/\sigma(I)$	4.1 (1.0)	8.5 (1.0)
$R_{\text{rim}}, \%$	31.1 (95.1)	6.9 (98.3)
$CC_{1/2}, \%$	89.8 (49.1)	99.5 (64.4)

* В скобках приведены значения для последнего слоя.

мент, при котором за счет сдвига электрофоретической подвижности происходило полное исчезновение исходной гликозилированной формы RBD, что указывало на значительное дегликозилирование белка. Наличие нескольких полос продуктов реакции дегликозилирования указывало на гетерогенный паттерн гликозилирования исходного препарата RBD. При выбранном соотношении было проведено препаративное дегликозилирование RBD, а затем — его дополнительная очистка гель-фильтрацией. При концентрировании фракций после гель-фильтрации дегликозилированного RBD обнаружили его меньшую растворимость, поскольку при концентрациях больше 3 мг/мл наблюдалось образование хлопьев белка. С учетом этого обстоятельства было решено формировать комплекс с антителом при относительно низких концентрациях белка (ниже 3 мг/мл) с последующей гель-фильтрацией и концентрированием фракций комплекса.

Получение комплекса наноантитела P2C5 с дегликозилированной формой RBD. Далее проверили способность P2C5 узнавать дегликозилированную форму RBD. При проведении гель-фильтрации наблюдали картину, принципиально сходную с таковой для исходного гликозилированного RBD — смесь белков давала единственный пик на профиле элюции, сильно смещенный в сторону меньших объемов элюции относительно пиков свободного дегликозилированного RBD и антитела (рис. 4а). При эквимоллярных концентрациях P2C5 и RBD практически не наблюдали пика свободных компонентов, что подтверждало образование стехиометрического гетеродимерного комплекса между белками. Кроме того, фракции комплекса, проанализированные с помощью электрофореза по Лэммли и денситометрии, содержали практически одинаковое соотношение

интенсивности полос P2C5 и RBD (рис. 4б), что однозначно подтверждало вывод о том, что их стехиометрический комплекс представляет собой гетеродимер.

Анализ кристаллов комплекса P2C5 с дегликозилированным RBD. Отметим, что дегликозилирование RBD под действием PNGase F привело к существенному уменьшению количества условий, в которых росли кристаллы. При этом появились новые условия, которые отсутствовали для комплекса с гликозилированным вариантом RBD (табл. 1). Кристаллы из этих условий протестировали на лабораторном источнике и обнаружили, что кристаллы из условий, содержащих 8% v/v Tacsimate pH 6.0, 20% w/v PEG 3350 (рис. 5а), визуально дифрагировали примерно до 6 $\text{\AA}$ (рис. 5б).

На лабораторном источнике (разд. Методы) был собран дифракционный набор до разрешения 3.7 $\text{\AA}$ (после обработки). Кристаллы относились к пр. гр. $I222$ (табл. 2), так как на основании полученных дифракционных данных сделать однозначный вывод о наличии винтовых осей не представлялось возможным. С учетом установленной стехиометрии комплекса (RBD : антитело — 1 : 1) оценка коэффициента Мэтьюса позволила предположить в независимой части элементарной ячейки наличие пяти белковых гетеродимеров. Попытки решения структуры методом молекулярного замещения в пр. гр. $I222$ и $I2_12_1$ с использованием в качестве моделей установленных структур RBD, а также модели антитела, рассчитанной программой AlphaFOLD [14], не привели к успеху. Это можно объяснить одновременным влиянием нескольких факторов: относительно низким разрешением полученных данных, большим количеством белковых молекул в независимой части, а также некоторым сходством (по размеру и наличию β -слоев) структур RBD и антите-

ла, которые к тому же должны быть расположены близко друг к другу, обеспечивая высокую аффинность (по данным плазмонного резонанса константа диссоциации комплекса составляет 3.97 нМ [7]).

Для проверки гипотезы о том, что мощности лабораторного источника недостаточно для сбора с полученных кристаллов дифракционных данных более высокого разрешения, был проведен дифракционный эксперимент на синхротронном источнике Elettra (Триест, Италия), для которого использовались кристаллы, полученные по ранее определенным условиям (рис. 5а, табл. 1). Дифракционный набор был собран до разрешения 4.1 Å (табл. 2), что с учетом большей яркости синхротронного источника демонстрирует предел разрешения кристаллов, ограниченный их внутренней структурой. Последующая обработка полученного набора данных в пр. гр. $I222$ и $I2_12_1$ также не позволила провести фазирование структуры методом молекулярного замещения. Тем не менее полученные результаты предоставляют дополнительную информацию для дальнейшей оптимизации генетической конструкции RBD и условий кристаллизации комплекса с целью получения кристаллов, пригодных для расшифровки структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-30004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meo S.A., Bukhari I.A., Akram J. et al. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2021. V. 25 (3). P. 1663. https://doi.org/10.26355/eurrev_202102_24877
2. Kevinkumar K., Parmar D., Mendiratta S.K. et al. // Clin Infect Dis. 2021. V. 73 (9). P. e2722. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa779>
3. Hammitt L.L., Dagan R., Yuan Y. et al. // N. Engl. J. Med. 2022. V. 386 (9). P. 837. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110275>
4. Mulangu S., Dodd L.E., Davey R.T.Jr. et al. // N. Engl. J. Med. 2019. V. 381 (24). P. 2293. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910993>
5. Komori M., Nogimori T., Morey A.L. et al. // Nat. Commun. 2023. V. 14 (1). P. 2810. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38457-x>
6. Piccoli L., Park Y.-J., Tortorici M.A. et al. // Cell. 2020. V. 183 (4). P. 1024. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
7. Favorskaya I.A., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B. et al. // Front. Immunol. 2022. V. 13. P. 822159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822159>
8. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A. et al. // Front. Immunol. 2023. V. 14. P. 1129245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129245>
9. Деркаев А.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В. и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2023. Т. 23 (1). С. 76. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-450>
10. Evans P.R., Murshudov G.N. // Acta Cryst. D. 2013. V. 69 (Pt 7). P. 1204. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
11. Winter G., Waterman D.G., Parkhurst J.M. et al. // Acta Cryst. D. 2018. V. 74 (Pt 2). P. 85. <https://doi.org/10.1107/S2059798317017235>
12. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D. et al. // Acta Cryst. D. 2011. V. 67. P. 235. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
13. Mesters J.R., Hilgenfeld R. // Cryst. Growth Des. 2007. V. 7 (11). P. 2251. <https://doi.org/10.1021/cg7006843>
14. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. // Nature. 2021. V. 596 (7873). P. 583. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>