

Е. Л. Гасич¹, А. Д. Коско¹, К. Ю. Булда¹, А. С. Бунас¹, И. А. Карнов²

¹Государственное учреждение

«Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,

²Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»

г. Минск, Республика Беларусь

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМОВ ВИРУСА SARS-COV-2 В МИШЕНЯХ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРЯМОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Введение

Противовирусные препараты, применяемые для лечения COVID-19, включают в себя ингибиторы наиболее консервативных и незаменимых ферментов вируса – РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp, nsp12) и основной протеазы (3CLpro, nsp5). Наиболее перспективным классом ингибиторов RdRp с широким спектром действия являются аналоги нуклеозидов и нуклеотидов. С момента начала пандемии активно проводился поиск препаратов с противовирусной активностью в отношении возбудителя COVID-19, в том числе и среди тех, которые назначаются при лечении ВИЧ, вирусов гепатитов В и С и других патогенов. Среди них особое место занимали препараты, в состав которых входят аналоги нуклеотидов. В частности, ремдесивир показал сильную анти-SARS-CoV-2 активность *in vitro* и в 2020 году был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в США для лечения пациентов с COVID-19. Ремдесивир представляет собой аналог аденозинтрифосфата (АТФ), который включается в RdRp коронавируса с большей эффективностью, чем АТФ, что приводит к отсроченному прекращению синтеза РНК [1]. Другой эффективный препарат против SARS-CoV-2, выпускаемый компанией Pfizer под торговым названием паксловид, представляет собой комбинацию ингибитора основной протеазы нирматрелвира с ритонавиром.

Однако эффективность применения таких препаратов может значительно снижаться в случае развития лекарственной устойчивости в мишенях их действия. Так, резистентность хорошо известна для вирусов гепатитов В и С, ВИЧ, гриппа. В настоящее время опубликованы первые работы в отношении SARS-CoV-2, согласно которым

изменения структуры RdRp и протеазы, вызванные мутациями в определенных аминокислотных позициях, приводят к снижению восприимчивости SARS-CoV-2 к ремдесивиру и нирматрелвиру соответственно. Эти данные подтверждены как в экспериментах *in vitro*, так и при исследовании образцов, полученных от пациентов с опытом применения данных лекарственных средств. Описанные на сегодня случаи развития резистентности в клинике связаны с длительным течением COVID-19 у пациентов с иммуносупрессией, у которых SARS-CoV-2 может сохраняться в течение многих месяцев. Под действием препаратов происходит отбор или появляются спонтанные мутации, в результате которых эффективность применения ремдесивира и/или паксловида может быть значительно снижена. Кроме того, появляется риск распространения лекарственно-устойчивых штаммов и/или неблагоприятного исхода для пациентов. Также в ряде исследований представлены данные о наличии мутаций резистентности в последовательностях вируса до начала клинического использования «Паксловида», что свидетельствует о спонтанном возникновении мутаций в условиях отсутствия давления лекарственного препарата [2]. Геномный надзор с анализом потенциальных мишеней действия лекарственных препаратов позволит определять спектр и частоту встречаемости клинически значимых замен, выбор тактики терапии, а также будет способствовать поиску и разработке противовирусных препаратов, эффективных в отношении лекарственно-устойчивых вариантов SARS-CoV-2.

Цель

Установить распространенность клинически значимых полиморфизмов к ингибиторам РНК-зависимой РНК-полимеразы и основной протеазы вируса SARS-CoV-2, секвенированных из проб пациентов с COVID-19 в Республике Беларусь.

Материал и методы исследования

В исследование включено 128 образцов назофарингеальных мазков, полученных от пациентов, проживающих на территории Республики Беларусь и перенесших COVID-19 в период с февраля 2021 по сентябрь 2023 гг. без опыта приема противовирусных препаратов. Распределение по полу было следующим: 54 образца было получено от пациентов мужского пола ($42,2 \pm 4,4$ %) и 74 – женского пола ($57,8 \pm 4,4$ %). Средний возраст пациентов составил 51,9 года. Образцы были получены со всех семи регионов Республики Беларусь. Наибольшее количество образцов было получено от пациентов, проживающих на территории города Минска – $75,0 \pm 3,8$ % ($n=96$), и $25,0 \pm 3,8$ % ($n=32$) – от пациентов, проживающих на территории Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Могилевской и Минской областей.

Экстракцию РНК проводили с использованием набора реагентов «АртНК Магнит» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали комплект реагентов ArtMMLV ревертаза (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Амплификацию проводили по трем участкам генома: S ген для определения варианта вируса SARS-CoV-2, nsp5 и nsp12 для определения мутаций резистентности к ингибиторам протеазы и RdRp соответственно. Секвенирование амплифицированных фрагментов по Сэнгеру осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляется с использованием программных продуктов Sequencing Analysis Software v.5.1.1, BioEdit v7.0.9.0. Определение генетического варианта проводили с помощью электронного ресурса <https://clades.nextstrain.org>. Поиск замен лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы и RdRp осуществлялся с использованием алгоритма <https://covdb.stanford.edu/sierra/sars2/by-sequences>.

Результаты исследования и их обсуждение

Методом частичного секвенирования S участка генома SARS-CoV-2 для всех образцов был определен генетический вариант вируса. На протяжении всего периода наблюдения отмечалась увеличение генетического разнообразия вируса. Было характерно изменение генетического спектра вариантов вируса с преобладанием отдельных из них в определенные периоды времени. Так, среди образцов, полученных от пациентов с COVID-19 в 2021 году, 6 образцов ($4,7 \pm 1,9$ %) относились к сублинии B.1 и ее производным, 14 образцов ($10,9 \pm 2,8$ %) – к варианту Альфа и 10 образцов ($7,8 \pm 2,4$ %) – к варианту Дельта. Образцы, поступившие в лабораторию в 2022 году, относились к различным сублиниям варианта Омикрон: 4 образца ($3,1 \pm 1,5$ %) – к сублинии BA.1, 8 образцов ($6,3 \pm 2,1$ %) – к сублинии BA.2, и 81 образец ($63,3 \pm 4,3$ %) – к сублинии BA.4/5. В 2023 г. наблюдалось замещение данных вариантов рекомбинантными сублиниями варианта Омикрон: сублиния XBB.2.3 – 1 образец ($0,8 \pm 0,8$ %), сублиния XBB.1.9 – 2 образца ($1,6 \pm 1,1$ %), сублиния EG.5.1 – 2 образца ($1,6 \pm 1,1$ %).

Результаты анализа мутаций резистентности в участках РНК-зависимой-РНК-полимеразы и протеазы показали следующее. В последовательностях участка RdRp в 94,5% случаев присутствовала замена пролина на лейцин в 323 позиции (P323L). Данная замена впервые была описана в европейских последовательностях в марте 2020 г. и выявлялась одновременно с заменой аспарагиновой кислоты на глицин в позиции 614 (D614G) в S белке. В настоящее время распространенность этих аминокислотных замен в мире достаточно высока и составляет 95% для P323L и 98% для D614G. Наличие аминокислотной замены P323L в RdRp не приводит к ингибированию действия ремдесивира [3]. Мутаций, приводящих к устойчивости к терапии ингибиторами РНК-зависимой РНК-полимеразы, не обнаружено.

При анализе участка генома, кодирующего основную протеазу, было установлено, что в образцах сублинии B.1, а также вариантов Альфа и Дельта отсутствуют мутации резистентности в данной области. В то же время для 99,0% образцов варианта Омикрон характерно наличие полиморфной замены пролина на гистидин в аминокислотной позиции 132 (P132H). Распространенность данной замены в 3CLpro в сублиниях варианта Омикрон в мире достигает 99,69%. Данная замена не оказывает влияния на ферментативную активность протеазы и находится за пределами сайта связывания с ингибиторами протеазы, не снижая их активность [4]. Помимо описанного полиморфизма наблюдается накопление мутаций ряд из которых приводит к резистентности к действию ингибиторов протеазы. Так, в образцах, полученных от пациентов, перенесших COVID-19 в период с июля по сентябрь 2022 г., и относящихся к сублинии BA.4/5 варианта Омикрон, были выявлены две единичные аминокислотные замены, связанные со снижением ингибирующей активности нирматрелвира: F140L (n=2) и P252L (n=3). В одном образце, поступившем в лабораторию в сентябре 2022 года (сублиния BA.4/5) и в двух образцах, поступивших в августе – сентябре 2023 года (сублиния EG.5.1 и рекомбинантная форма XBB.2.3), обнаружена двойная аминокислотная замена N142L + S144L. В одном случае (сублиния EG.5.1) в дополнение к заменам N142L + S144L установлена замена в аминокислотной позиции Q189K. Все эти три замены расположены в активном сайте связывания с лекарственными препаратами, мишенями которых является протеаза SARS-CoV-2. Согласно данным базы данных противовирусных препаратов и резистентности, наличие таких аминокислотных замен может снизить эффективность действия нирматрелвира от 2,5 до 10 раз [3].

Заключение

Результаты геномного анализа показали, что среди исследованных образцов ни в одном случае не обнаружены клинически значимые мутации в участке RdRp. Отсутствие мутаций резистентности в области nsp12 свидетельствует о перспективности дальнейшего применения ремдесивира для лечения пациентов с COVID-19. В 94,5% случаев в участке RdRp определен полиморфизм P323L, который был характерен для разных генетических вариантов вируса SARS-CoV-2. По опубликованным данным, наличие лейцина в аминокислотной позиции 323 способствует более высокому сродству связывания RdRp с молекулой ремдесивира, по сравнению с ферментом, у которого в данной позиции находится пролин. Это может свидетельствовать о благоприятном исходе терапии ремдесивиром с учетом широкой распространенности данной аминокислотной замены [5].

Показано, что в начале развития эпидемии COVID-19, в участках действия ингибиторов протеазы, клинически значимые мутации выявлены не были. По мере увеличения генетического разнообразия вируса наблюдается накопление мутаций, ряд из которых связаны с резистентностью к действию ингибиторов протеазы. В образцах сублинии BA.4/5 варианта Омикрон (июль – сентябрь 2022 г.) были выявлены единичные аминокислотные замены F140L и P252L, а также двойная мутация N142L + S144L. В августе – сентябре 2023 года (сублинии EG.5.1 и XBB.2.3) обнаружена двойная аминокислотная замена N142L + S144L. В одном случае у пациента, инфицированного вариантом сублинии EG.5.1 выявлена тройная мутация – N142L + S144L+Q189K. В целом, в участке протеазы в 7,0 % случаев были обнаружены мутации, приводящие к конформационному изменению фермента и значительно снижающие чувствительность к ее ингибиторам. Согласно опубликованным данным, наличие таких аминокислотных замен может снизить эффективность действия нирматрелвира от 2,5 до 10 раз [3]. Учитывая отсутствие у пациентов опыта приема ингибиторов протеазы SARS-CoV-2, формирование мутаций явилось результатом естественной эволюции вируса при отсутствии селективного давления препаратов.

Учитывая, что SARS-CoV-2 широко присутствует в популяции и его эволюция продолжится, следует усилить работу по геномному надзору и изучению влияния мутаций резистентности на эффективность противовирусной терапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. A cell-based assay to discover inhibitors of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase / J. Zhao [et al.] // *Antiviral Research*. – 2021. – Vol. 190 – P. 105078.
2. Проблема лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 к препаратам прямого противовирусного действия / Е. Л. Гасич [и др.] // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2024. – <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-569>.
3. Stanford University – Coronavirus Antiviral & Resistance Database [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.covdb.stanford.edu/sierra/sars2/by-sequences/>. – Date of access: 15.10.2024.
4. Ensitrelvir is effective against SARS-CoV-2 3CL protease mutants circulating globally / S. Kawashima [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2023. – Vol. 645. – P. 132–136.
5. Remdesivir MD Simulations Suggest a More Favourable Binding to SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA Polymerase Mutant P323L Than Wild-Type / A. Mohammad [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, iss. 7. – P. 919.

ISSN 2224-6959

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНЫ

Сборник научных статей
Республиканской научно-практической конференции
с международным участием
(г. Гомель, 13 ноября 2024 года)

Основан в 2000 г.

Выпуск 25

В 3 томах

Том 2

Гомель
ГомГМУ
2024