

УДК 578.34.063.8: 615.3.015.8

ЧАСТОТА И ПРОФИЛЬ МУТАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ В МИШЕНЯХ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ RDRP И 3CLPRO ВИРУСА SARS-CoV-2

Коско А.Д.¹, Булда К.Ю.¹, Гасич Е.Л.¹, Дорофеева Е.А.², Карпов И.А.²

¹Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Проведено частичное секвенирование генов *nsp12* ($n = 257$ образцов) и *nsp5* ($n = 317$ образцов) с последующим биоинформационным анализом. Определены генетические варианты вируса и проанализированы аминокислотные замены, связанные со снижением чувствительности к ингибиторам обратной транскриптазы (ремдесивиру) и ингибиторам основной протеазы (нирматрелвиру и энсирелвиру). Данные сопоставлены с информацией из базы данных SARS-CoV-2 Resistance Mutations (Stanford CovDB) и литературными источниками.

В 45,1 % проанализированных последовательностей в *nsp12* выявлена аминокислотная замена G671S, ассоциированная с незначительным снижением чувствительности к ремдесивиру *in vitro*. Клинически значимые мутации резистентности в *nsp5* отсутствовали. Выявлены единичные случаи комбинаций полиморфизма P132H с редкими заменами (T45N, M82I), требующими мониторинга из-за потенциально умеренного влияния на чувствительность к ингибиторам. Стабильность мишеней действия препаратов прямого противовирусного действия подтверждает перспективность их применения, но требует постоянного молекулярно-генетического надзора за редкими потенциально значимыми заменами.

Ключевые слова: мутации; основная протеаза; противовирусная терапия; резистентность; РНК-зависимая РНК-полимераза; SARS-CoV-2.

Введение. Вирусные пандемии представляют глобальную угрозу общественному здоровью, что ярко продемонстрировала пандемия COVID-19, вызванная SARS-CoV-2 и унесшая миллионы жизней. С ее начала предпринимались интенсивные усилия по поиску и разработке противовирусных средств. Из множества исследуемых препаратов противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2 показали ремдесивир, молнупиравир и паксловид (нирматрелвир/ритонавир). Их механизм действия направлен на ключевые неструктурные белки вируса. Ремдесивир и молнупиравир ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp, *nsp12*) и блокируют репликацию вирусного генома. Нирматрелвир – ингибитор основной протеазы (3CLpro/Mpro, *nsp5*) – нарушает процессинг вирусных полипротеинов.

Широкое применение противовирусной терапии, однако, неизбежно создает риск развития резистентности. Естественная эволюция РНК-вирусов, характеризующаяся высокой частотой мутаций, приводит к появлению замен в генах, кодирующих мишени препаратов. В результате может развиваться клиническая неэффективность, особенно на фоне

таких факторов, как монотерапия, неадекватные дозы или длительное применение у иммунокомпрометированных пациентов. Мониторинг генетической резистентности методом генотипирования для выявления ассоциированных мутаций становится критически важным.

Несмотря на выраженную анти-SARS-CoV-2 активность ремдесивира в условиях *in vitro* и его эффективность в клинических исследованиях, его применение неизбежно создает селективное давление, приводящее к возникновению мутаций резистентности [1].

Экспериментальные данные как *in vitro*, так и *in vivo* подтверждают появление однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в гене *nsp12*, снижающих эффективность действия ремдесивира. Пассаж вируса в присутствии ремдесивира (на моделях SARS-CoV-2 и родственного вируса мышинного гепатита – MHV) и анализ клинических образцов от пациентов (особенно с иммунодефицитом и персистирующей инфекцией) выявили ряд ассоциированных с устойчивостью аминокислотных замен. Такие замены могут находиться как вблизи каталитических мотивов фермента (например,

S759A, V166A, V792I, C799F/R, N198S) и непосредственно оказывать влияние на связывание ремдесивир-трифосфата, так и вне активного центра (F480L, D484Y, V557L, E802A/D), косвенно снижая чувствительность к препарату за счет конформационных изменений фермента [1]. Обнаружение мутаций резистентности в изолятах SARS-CoV-2 от пациентов, получавших ремдесивир [2], подчеркивает актуальность проблемы резистентности и критическую необходимость систематического изучения частоты возникновения, структурно-функциональных эффектов и клинического значения данных замен.

Ингибиторы основной протеазы SARS-CoV-2 (Mpro/3CLpro), к которым относится нирматрелвир, представляют собой важный класс противовирусных препаратов. Однако, как и в случае ингибиторов RdRp, их применение создает селективное давление

Исследования Ну Ю. и др. выявили ключевые аминокислотные остатки в активном сайте основной протеазы, мутации в которых нарушают связывание нирматрелвира и других ингибиторов протеазы [3]. Экспериментальные данные *in vitro* подтверждают, что замены в позициях S144A/F, M165T, E166A/G/V, H172Q/F/Y, Q192T/S оказывают прямое влияние на чувствительность к ингибиторам, но в то же время приводят к снижению ферментативной активности или репликации вируса [3]. Ряд исследований указывают на то, что замены, расположенные вне активного сайта (например, в позициях T21, L50, S301, T304), выполняют компенсаторную роль, восстанавливают фитнес вируса, ослабленный первичными мутациями резистентности (например, в позициях E166 или H172), и стабилизируют резистентный фенотип [3; 4]. Эти данные указывают на необходимость мониторинга комбинаций мутаций резистентности, оценки их влияния на чувствительность к препаратам и вирусный фитнес, что критически важно для прогнозирования эффективности терапии, разработки стратегий преодоления резистентности (например, комбинированной терапии) и долгосрочного контроля над COVID-19.

Следовательно, наблюдения за изменениями в участках RdRp и 3CLpro важны для прогнозирования эффективности терапии, разработки стратегий преодоления резистентности (включая комбинации препаратов) и обеспе-

чения долгосрочного успеха противовирусных стратегий в отношении SARS-CoV-2. При этом необходимо учитывать факт постоянной эволюции вируса и изменения в его геноме, что особенно важно – в сайтах связывания с противовирусными препаратами. Все это подчеркивает необходимость постоянного эпидемиологического и молекулярно-генетического надзора за патогеном.

Цель работы – охарактеризовать частоту и профиль клинически значимых мутаций в генах nsp12 (RdRp) и nsp5 (3CLpro/Mpro) вируса SARS-CoV-2, связанных с резистентностью к соответствующим ингибиторам, в образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в Республике Беларусь в разные периоды пандемии.

Материалы и методы. Материалом исследования служили назофарингеальные мазки ($n = 335$), полученные от пациентов, проживающих на территории Республики Беларусь и перенесших COVID-19 с февраля 2021 по апрель 2025 гг., как без опыта приема противовирусных препаратов, так и с опытом приема ремдесвира.

Экстракцию РНК SARS-CoV-2 проводили с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала по технологии магнитной сорбции «АртРНК Магнит» (ООО «АртБиоТех», Беларусь). Реакцию обратной транскрипции, амплификацию и частичное секвенирование нуклеотидной последовательности S гена для определения генетического варианта вируса осуществляли по ранее описанной методике [5].

Для амплификации участков генома, кодирующих основную протеазу (nsp5) и обратную транскриптазу (nsp12) вируса SARS-CoV-2 использовали следующие пары праймеров:

NSP5_F 5' – ATAAGTACAAGTATTT-TAGTGG – 3' (Прямой);

NSP5_R 5' – GCAGACATAGCAATAATACC – 3' (Обратный);

NSP12_1F 5' – CACATATATCACGTCAACGTC – 3' (Прямой);

NSP12_1R 5' – GTGCATCTTGATCCTCATAAC – 3' (Обратный);

NSP12_2F 5' – ACTTCTTCTTTGCTCAGGATGG – 3' (Прямой);

NSP12_2R 5' – TTCAATCATAAGTGTACCATCTG – 3' (Обратный).

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе «Applied Biosystems

Veriti 96-Well Thermal Cycler» в объеме 25 мкл. Состав амплификационной смеси был следующим: 2,5 мкл 10-кратный буфер, 1 мкл 50 мМ MgCl₂, 2,5 мкл 2 мМ смесь дНТФ, по 1 мкл 10 мМ праймеры (прямой и обратный), 0,2 мкл ArtStart-ДНК-полимераза (5 ед/мкл), деионизованная вода до конечного объема смеси 25 мкл. Временные и температурные параметры проведения ПЦР: 95 °С 2 минуты, затем 35 циклов 95 °С 10 секунд, X °С 10 секунд, 72 °С 1 минута 10 секунд, затем 72 °С 5 минут, где X – температура отжига праймеров. Для пары праймеров NSP5_F/NSP5_R X = 50 °С, для NSP12_1F/NSP12_1R X = 52 °С и для NSP12_2F/NSP12_2R X = 54 °С. Специфический продукт ПЦР участка гена nsp5 составляет 1234 п.н. Продукт амплификации гена nsp12 состоит из 2-х участков NSP12_1 и NSP12_2 размером 1245 п.н. и 1256 п.н. соответственно, что позволило получить полное покрытие гена nsp12 с перекрытием двух ампликонов.

Секвенирование амплифицированных фрагментов по Сэнгеру осуществляли на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществлялся с использованием программных продуктов Sequencing Analysis Software v.5.1.1 (Applied Biosystems, США), BioEdit v7.0.9.0. Генетический вариант вируса SARS-CoV-2 определяли с помощью электронного ресурса <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/covsurver-mutations-app/>. Анализ на наличие мутаций резистентности осуществляли с помощью аналитической программы The Stanford Coronavirus Resistance Database (CoV-RDB; <https://covdb.stanford.edu/>) [6].

Результаты и их обсуждение. Коллекция образцов назофарингеальных мазков, содержащих вирус SARS-CoV-2, собранных в разные периоды пандемии COVID-19 (с февраля 2021 по апрель 2025 г.), составила 335 образцов. Среди образцов, включенных в исследование, 219 (65,4 %) получены от пациентов женского пола и 116 (34,6 %) – мужского. Образцы получены из всех регионов Республики Беларусь. Наибольшее количество образцов получено от пациентов, проживающих на территории Минска – 90,4 % (*n* = 303), и 9,6 % (*n* = 32) – от пациентов, проживающих на территориях Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Могилевской и Минской областей.

Методом частичного секвенирования S участка генома SARS-CoV-2 для всех образцов (*n* = 335) был определен генетический вариант вируса. В 2021 г. циркулировали варианты B.1 и его сублинии (*n* = 6), Альфа B.1.1.7 (*n* = 14) и Дельта AY.122 (*n* = 10). В 2022 г. доминировал вариант Омикрон: в первом полугодии 2022 г. преобладали сублинии BA.1 (*n* = 3) и BA.2 (*n* = 7), а во второй половине 2022 г. – сублинии BA.4/5 (*n* = 87). В 2023 г. наблюдается вытеснение данных сублиний рекомбинантными сублиниями варианта Омикрон: XBB (*n* = 47), XBB.1.5 (*n* = 5), XBB.1.16 (*n* = 50), XBB.1.9 (*n* = 13), XBB.2.3 (*n* = 22), EG.5.1 (*n* = 10), а также встречались сублинии HK.3 (*n* = 3), JN.1 (*n* = 1) и BA. 4/5 (*n* = 2). Среди образцов, полученных от пациентов, перенесших COVID-19 в 2024 г., доминирующими являлись сублинии варианта Омикрон KP.2.3 (*n* = 27) и JN.1 (*n* = 8), также наблюдались сублинии JN.1.11.1 (*n* = 2), KP.3 (*n* = 1), KP.3.1.1 (*n* = 2), LF.7 (*n* = 1), XBB.2.3 (*n* = 1), XEF (*n* = 1). В 2025 г. циркулировали сублинии LF.7 (*n* = 8), LP.8.1 (*n* = 2) и JN.1 (*n* = 2).

Профиль и частота встречаемости мутаций, оказывающих влияние на эффективность использования ремдесивира, проанализированы в 257 секвенированных образцах. Сопоставление мутаций в nsp12 участке генома SARS-CoV-2 в зависимости от варианта вируса представлено на рис. 1.

Анализ последовательностей гена nsp12 показал, что в 45,1 % (116/257) исследованных образцов присутствовала аминокислотная замена G671S. Распределение данной замены в зависимости от варианта вируса SARS-CoV-2 было следующим: 100 % частота встречаемости среди образцов варианта Дельта AY.122 (10/10), сублиний XBB.1.5 (4/4), XBB.1.9 (11/11), XBB.2.3 (15/15), EG.5.1 (8/8), HK.3 (1/1), также высокая частота в 97,4 % и 96,7 % среди сублиний XBB.1.16 (37/38) и XBB (29/30) соответственно, и 3 % – среди сублинии BA.4/5 (1/76). Полученные результаты согласуются с глобальными данными, представленными в базе данных SARS-CoV-2 Resistance Mutations (Stanford CovDB), где G671S определена как характерная замена для ряда вариантов, вызывающих обеспокоенность или интерес. В частности, она присутствует в более чем 97 % последовательностей варианта Дельта и 99 % последовательностей сублинии XBB [6].

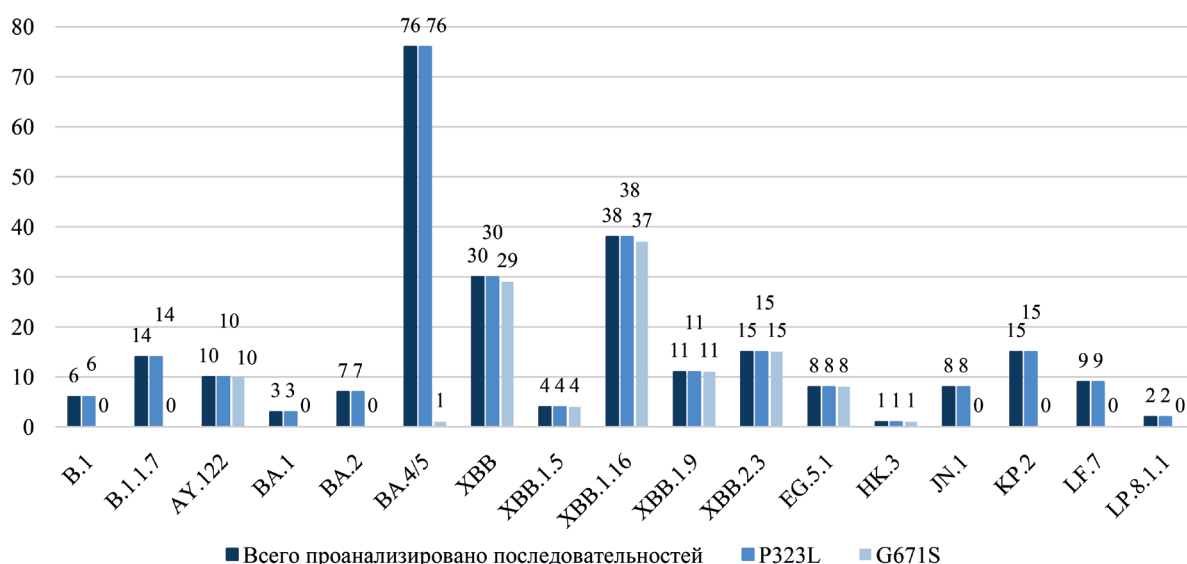


Рис. 1. Спектр и частота встречаемости мутаций в nsp12 SARS-CoV-2, оказывающих влияние на эффективность применения ремдесивира

Согласно данным Stanford CovDB замена G671S ассоциирована с незначительным ($< 2,5$ -кратным) снижением чувствительности к ингибиторам RdRp в исследованиях *in vitro*. Однако существуют клинические наблюдения, свидетельствующие об отборе G671S *in vivo* на фоне терапии ремдесивиром [6]. В нашем исследовании 22 из 116 последовательностей вируса с мутацией G671S (19,0 %) получены от пациентов, получавших ремдесивир для лечения COVID-19. Эти пациенты перенесли заболевание в сентябре-декабре 2023 г. и были инфицированы рекомбинантными формами варианта Омикрон: XBB ($n = 3$), XBB.1.5 ($n = 1$), XBB.1.16 ($n = 8$), XBB.1.9 ($n = 3$), XBB.2.3 ($n = 4$), EG.5.1 ($n = 3$). Высокая популяционная частота G671S в циркулирующих в стране в 2023 г. вариантах SARS-CoV-2 не позволяет утверждать, что применение ремдесивира в Республике Беларусь вызвало селективный отбор данной мутации.

Также следует отметить наличие во всех исследованных образцах полиморфизма P323L, распространенность которого в мире достигла 95 %, включая варианты Альфа, Бета, Дельта, Омикрон и его сублинии. Исследуя влияние P323L на структуру и стабильность RdRp, а также на эффект связывания ремдесивира, Mohammad A. и др. показали, что наличие лейцина в позиции 323 способствует повышению аффинности связывания RdRp с молекулой ремдесивира, по сравнению с ферментом,

содержащим исходный пролин в этой позиции [7].

По участку генома, кодирующего основную протеазу вируса SARS-CoV-2, было проанализировано 317 последовательностей. Составление мутаций в nsp5 участке генома SARS-CoV-2 в зависимости от варианта вируса представлено на рис. 2. В последовательностях образцов, циркулирующих в 2021 г. (сублинии B.1 и ее производные, варианты Альфа и Дельта), мутаций в данной области генома не обнаружено. Вариант Омикрон характеризуется накоплением полиморфизмов, наиболее значимый из которых замена P132H, обнаруженная во всех исследованных последовательностях данного варианта. P132H является консенсусной заменой для глобально циркулирующего варианта Омикрон с глобальной распространенностью более 99 %, не находится в активном сайте связывания ингибиторов протеазы (нирматрелвира и энсиртрелвира) и, согласно литературным данным, не влияет на их противовирусную активность [6].

В одном образце сублинии BA.4/5 в дополнение к P132H обнаружена замена M82I, которая связана со сниженным, но все же незначительным ингибированием нирматрелвиром *in vitro*. Еще в одном случае детектировалась замена T45N, которая не ассоциирована с резистентностью к ингибиторам основной протеазы, однако аналогичная замена T45I ассоциирована с незначительным ($< 2,5$ -кратным)

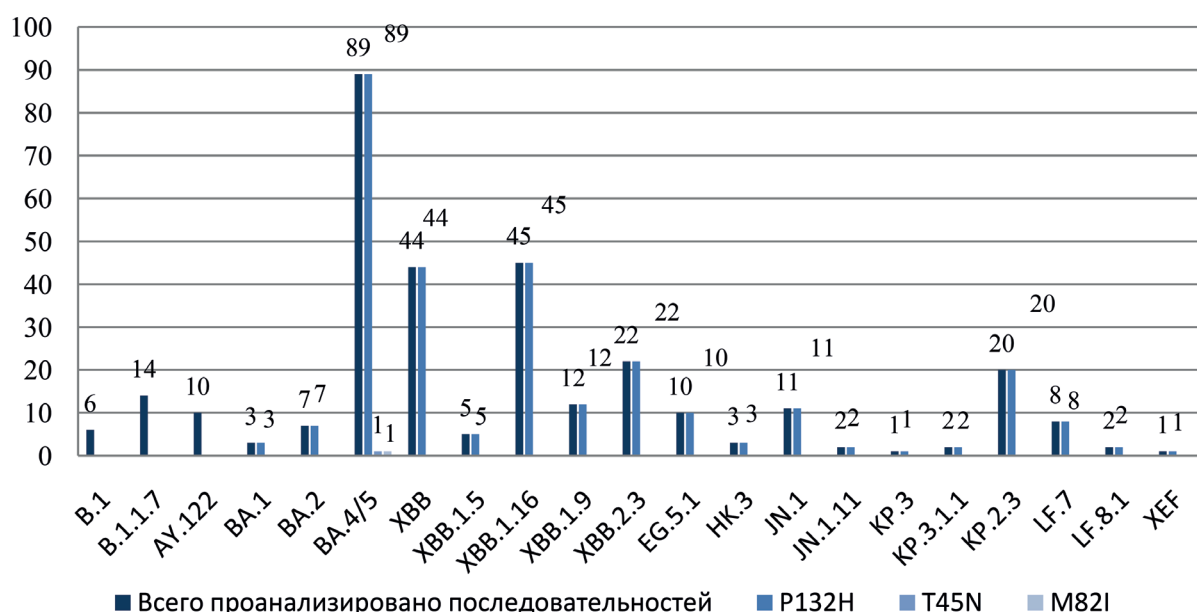


Рис. 2. Спектр и частота встречаемости мутаций в nsr5 SARS-CoV-2 в зависимости от варианта вируса

снижением чувствительности к нирматрелвиру и средним уровнем (2,5-5-кратным) снижения чувствительности к энсирелвиру. Вероятно, T45N может также иметь умеренный или незначительный эффект на резистентность [6].

Заключение. Замена G671S в белке nsr12 является широко распространенной (45,1 %) в исследованной выборке, демонстрируя консенсусный статус в варианте Дельта AY.122 и рекомбинантных сублиниях варианта Омикрон, что соответствует глобальным данным. Хотя *in vitro* данные указывают лишь на незначительное (< 2,5-кратное) снижение чувствительности к ингибиторам RdRp, наличие клинических наблюдений об отборе G671S *in vivo* на фоне терапии ремдесивиром у пациентов с персистирующей инфекцией подтверждает ее клиническую значимость как маркера потенциальной резистентности [6]. В нашем исследовании 19,0 % (22/116) образцов с этой заменой получены от пациентов, получавших ремдесивир в конце 2023 г. и инфицированных рекомбинантными субвариантами Омикрона. Несмотря на то, что высокая фоновая распространенность в циркулирующих вариантах не позволяет утверждать о прямой причинно-следственной связи отбора G671S с терапией ремдесивиром, снижение чувствительности *in vitro* в сочетании с доказательствами отбора *in vivo* и высокой распространенностью в циркулирующих вариантах

подчеркивает важность молекулярно-генетического мониторинга мутации G671S для оценки потенциального влияния на эффективность терапии ингибиторами RdRp и понимания эволюции вируса под селективным давлением препаратов.

Также в 100 % исследованных образцах наблюдается наличие полиморфизма P323L. Несмотря на изначально нейтральный статус данной замены, исследования показывают ее функциональное значение – она структурно стабилизирует RdRp и повышает аффинность связывания ремдесивира, потенциально способствуя его эффективности.

Наблюдаемые мутации (G671S, P323L) не указывают на массовое развитие резистентности, но мониторинг G671S важен для своевременного выявления потенциального снижения эффективности ремдесивира.

Анализ последовательностей гена nsr5 показал отсутствие мутаций в данной области генома в ранних вариантах (B.1, Альфа, Дельта). Для варианта Омикрон показано, что замена P132H является универсальным маркером (100 % в исследованной выборке) в Беларуси, полностью соответствуя ее глобальной распространенности. Данный полиморфизм не ассоциирован со снижением чувствительности к клинически применяемым ингибиторам протеазы, так как не затрагивает активный сайт фермента.

В единичных случаях обнаружены комбинации P132H с другими заменами. Большинство из них, согласно литературным данным, не оказывают влияния на резистентность вируса. Однако замена T45N (аналогичная T45I) требует внимания из-за потенциального умеренного снижения чувствительности к энсирелвиру. Мутация M82I ассоциирована со сниженным ингибированием *in vitro*. Необходим постоянный мониторинг частоты появления

и распространения таких редких комбинаций, особенно у пациентов с длительной персистирующей инфекцией или неудачей терапии.

Основная протеаза остается стабильной и высокоэффективной мишенью для противовирусной терапии (нирматрелвир, энсирелвир) в Республике Беларусь, что подтверждается отсутствием широко распространенных клинически значимых мутаций резистентности.

Список цитированных источников

1. Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms / L.J. Stevens, A.J. Pruijssers, H.W. Lee [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2022. – Vol. 14, iss. 656. – eabo0718. – DOI: 10.1126/scitranslmed.abo0718.
2. De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report / S. Gandhi, J. Klein, A. Robertson [et al.] // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13, iss. 1. – P. 1547. – DOI: 10.1038/s41467-022-29104-y.
3. Naturally occurring mutations of SARS-CoV-2 main protease confer drug resistance to nirmatrelvir / Y. Hu, E.M. Lewandowski, H. Tan [et al.] // *American Chemical Society Central Science*. – 2023. – Vol. 9, iss. 2. – P. 1658–1669.
4. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir / S. Iketani, H. Mohri, B. Culbertson [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 613. – P. 558–564.
5. Оптимизация методов, используемых для молекулярно-генетического мониторинга SARS-CoV-2 с целью определения вариантов омикрон и его рекомбинантных форм / К. Ю. Булда [и др.] // *Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр.* – 2024. Вып. 34. – С. 413–419.
6. Coronavirus Resistance Database (CoV-RDB): SARS-CoV-2 susceptibility to monoclonal antibodies, convalescent plasma, and plasma from vaccinated persons / P.L. Tzou, K. Tao, S. L. K. Pond [et al.] // *PLoS ONE*. – 2022. – Vol. 17, iss. 3. – P. 0261045. – DOI: 10.1371/journal.pone.0261045.
7. Remdesivir MD simulations suggest a more favourable binding to SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase mutant P323L than wild-type / A. Mohammad; F. Al-Mulla, D.-Q. Wei [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, iss. 7. – P. 919. DOI: 10.3390/biom11070919.

FREQUENCY AND PROFILE OF DRUG RESISTANCE MUTATIONS IN THE TARGETS OF RDRP AND 3CLPRO INHIBITORS IN SARS-CoV-2

Kasko A.D.¹, Bulda K.U.¹, Gasich E.L.¹, Dorofeeva E.A.², Karpov I.A.²

¹*Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus*

²*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Partial sequencing of the nsp12 ($n = 257$ samples) and nsp5 ($n = 317$ samples) genes was performed, followed by bioinformatic analysis. Viral variants were determined, and amino acid substitutions associated with reduced susceptibility to RdRp inhibitors (remdesivir) and 3CLpro inhibitors (nirmatrelvir, ensitrelvir) were analysed. Data were cross-referenced with the SARS-CoV-2 Resistance Mutations database (Stanford CovDB) and literature.

The G671S substitution in nsp12 was identified in 45.1% of samples, associated with < 2.5-fold reduced *in vitro* sensitivity to remdesivir. No clinically significant resistance mutations were found in nsp5. Rare P132H combinations (T45N, M82I) requiring monitoring due to potential moderate impact on inhibitor susceptibility were detected. Targets stability supports antiviral efficacy but necessitates ongoing molecular surveillance of rare consequential substitutions.

Keywords: drug resistance mutations; main protease (3CLpro); antiviral agents; RNA-dependent RNA polymerase; SARS-CoV-2.