

Keywords: polyomavirus, BKV, JCV, immunosuppression, genotyping.

References

1. Moens U., Krumbholz A., Ehlers B. et al. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: an update. *Infect Genet Evol.* 2017; 54: 18–38.
2. Pastrana D.V., Ray U., Magaldi T.G et al. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *J Virol.* 2013; 87(18): 10105–13.
3. Moens U., Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology.* 2005; 331(2): 209–31.
4. Chehadeh W., Nampoory M.R. Genotypic diversity of polyomaviruses circulating among kidney transplant recipients in Kuwait. *J Med Virol.* 2013; 85(9): 1624–31.
5. Moens U., Johansen T., Johnsen J.I. et al. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes.* 1995; 10(3): 261–75.

e-mail для переписки: lipr@belriem.by

Поступила 15.09.2025

УДК 578.34.063.8: 615.3.015.8

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

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ УЧАСТКА NSP5 ВИРУСА SARS-COV-2, СВЯЗАННОГО С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ИНГИБИТОРАМ ПРОТЕАЗЫ

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

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Аннотация. Изучение мутаций в геноме SARS-CoV-2 имеет ключевое значение для понимания механизмов формирования устойчивости к противовирусной терапии. Целью работы было охарактеризовать мутационный профиль в участке nsp5 генома SARS-CoV-2 и оценить генотипическую резистентность к ингибиторам основной протеазы в клинических образцах вариантов SARS-CoV-2. Проанализированы 317 последовательностей nsp5 SARS-CoV-2, собранных в Беларуси в 2021–2025 гг. Мутации выявлены в 91,5 % последовательностей, основная из которых – P132H, зафиксированная у 90,5 % образцов и статистически ассоциированная с вариантами линии Омикрон. Дополнительные редкие замены (M171/V, T45N, K90R, P241L и др.) чаще встречались в сочетании с P132H, тогда как ранние одиночные мутации (A234T, V303I) встречались в вариантах сублинии B.1 и Альфа. Обнаруженные замены могут потенциально снижать эффективность ингибиторов, однако подтвержденной генотипической резистентности к нирматрелвиру и энсирелвиру выявлено не было. Полученные данные подчеркивают необходимость постоянного молекулярного надзора для выявления резистентности.

Ключевые слова: протеаза, SARS-CoV-2, секвенирование, резистентность.

Введение. С начала пандемии COVID-19 были достигнуты беспрецедентные успехи в области противовирусной терапии – от противовирусных препаратов прямого действия до иммуномодуляторов и, на ранних этапах, моноклональных антител. В текущей клинической практике прежде всего используются противовирусные средства с доказанной эффективностью при раннем назначении у пациентов из групп риска: ингибиторы основной протеазы (далее – nsp5), а также ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы. Иммуномодуляторы снижают воспалительные осложнения на поздних стадиях заболевания, но не подавляют репликацию SARS-CoV-2. Моноклональные антитела, будучи высокоспецифичными к S-белку, потеряли клиническую значимость на фоне эволюции вируса. На протяжении всего периода развития пандемии COVID-19 вирус SARS-CoV-2 быстро эволюционировал, результатом этого было появление большого количества мутаций в его геноме, в том числе в участках действия противовирусной терапии. В первые годы пандемии COVID-19 противовирусная терапия опиралась главным

образом на специфические ингибиторы вирусных ферментов: нирматрелвир (PF-07321332), применяемый в сочетании с ритонавиром (Paxlovid), и несколько позже – энсирелвир (S-217622, Хосова). Эти препараты рекомендованы в качестве терапии первой линии для пациентов с легким/среднетяжелым течением COVID-19 и высоким риском прогрессирования при условии раннего начала лечения. Решение о назначении должно учитывать совокупность факторов риска (возраст, иммунный статус, коморбидности) [1].

Основная протеаза SARS-CoV-2 (nsp5) – цистеиновая протеаза расщепляет вирусные полипротеины pp1a/pp1ab, иницируя формирование репликационно-транскрипционного комплекса. Структурные особенности активного центра, а также консервативность ключевых остатков обусловили успех разработок ингибиторов протеазы вируса SARS-CoV-2. Как критически важный и высококонсервативный фермент, протеаза SARS-CoV-2 генетически стабильна. За время пандемии в популяции SARS-CoV-2 не возникло вариантов с выраженной природной устойчивостью к ингибиторам протеазы. К началу применения ингибиторов протеазы было показано, что замены в ключевых сайтах связывания редки, что указывает на высокий генетический барьер к формированию клинически значимой резистентности [2]. Замена P132H (характерная для всех сублиний варианта Омикрон) локализована на поверхности фермента и не влияет на связывание известных ингибиторов. Однако при длительном размножении вируса под терапевтическим давлением *in vitro* или *in vivo* могут отбираться мутации, снижающие чувствительность к нирматрелвиру и энсирелвиру [3].

Формирование лекарственной резистентности формируется под влиянием мутационных процессов, которые усиливаются в ответ на применение противовирусных препаратов. Для ферментных мишеней неизбежен компромисс между снижением аффинности к препарату и сохранением его каталитической эффективности. Анализ нуклеотидных последовательностей, полученных в период 2019–2022 гг., показал, что клинически значимые замены в участке протеазы, ассоциированные с резистентностью, встречались редко [2]. Однако при длительной репликации под давлением препарата (например, у иммунокомпрометированных пациентов) или при недостаточной экспозиции (позднее начало, лекарственные взаимодействия, нарушения режима) был возможен отбор вариантов с лекарственно значимыми заменами [4]. Одной из таких замен стала замена позиции E166, которая нарушает водородные связи, что обуславливают высокоуровневую устойчивость, особенно к нирматрелвиру. При этом часто для нее требуется компенсаторные замены L50F (или T21I) для восстановления «фитнеса вируса» [5, 6]. Клинически наиболее убедительные случаи терапии-индуцированной резистентности описаны у пациентов с длительной персистенцией SARS-CoV-2 на фоне иммунодефицита. Так, после длительного приема нирматрелвира выделялись варианты с заменами E166V+L50F и клинико-вирусологической неэффективностью. Глобальная распространенность E166V остается крайне низкой. Мутации в позиции E166 обнаруживались лишь эпизодически, что объясняется их отрицательным влиянием на вирусный «фитнес» и необходимостью компенсирующих замен, ограничивающих распространение таких вариантов с данной мутацией [7]. Делеция в позиции P168 и замена A173V вносят умеренно высокую устойчивость и могут действовать синергично в отношении нирматрелвира [8]. Классический профиль для энсирелвира представлен заменами M49L, что существенно снижает его активность, особенно в сочетании с E166A [9]. Замена T45I приводит к умеренному повышению значения IC50 к энсирелвиру, а в комбинациях с заменой E166A значительно усиливает способность уклоняться от действия препарата [10]. Данная замена в комбинациях (например, T45I+A173V для нирматрелвира или T45I+M49L для энсирелвира) также усиливает эффект резистентности к ингибиторам протеазы [8].

Множество замен в гене, кодирующем протеазу, присутствовали как редкие полиморфизмы еще до широкого использования клинической терапии и возникли в разных генетических вариантах независимо [8]. Типичная для ВА.1 замена P132H не влияет на активность протеазы, но может выступать как компенсаторная замена. [3]. Анализ последовательностей гена, кодирующего протеазу вируса SARS-CoV-2, полученных из клинических изолятов сублиний (BQ.1.1, BF.7, BA.5.2, XBB.1/XBB.1.5), показал отсутствие значимых изменений чувствительности к нирматрелвиру [11].

С учетом перечисленного комплексное исследование мутаций в nsp5, ассоциированных с резистентностью к ингибиторам основной протеазы, позволяет уточнить актуальный мутационный профиль и сформировать приоритеты для молекулярного надзора. Важность подобных исследований подчеркивается и эпидемиологическим контекстом: SARS-CoV-2 перешел к эндемическому сценарию с многократными сезонными волнами, продолжая существенно затрагивать системы здравоохранения.

Своевременное выявление и описание мутаций резистентности в nsp5 напрямую влияет на исходы лечения отдельных пациентов и на стратегию общественного здравоохранения в целом.

Таким образом, изучение риска развития лекарственной устойчивости к противовирусным препаратам у SARS-CoV-2 является задачей, представляющей не только научный интерес, но и выбор соответствующей этиотропной терапии.

Цель работы – охарактеризовать мутационный профиль в участке nsp5 генома SARS-CoV-2 и оценить генотипическую резистентность к ингибиторам протеазы в клинических образцах SARS-CoV-2, циркулировавших на территории Республики Беларусь.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили 317 клинических образцов от пациентов с лабораторно подтвержденной COVID-19, предварительно генотипированных по S-гену, собранные в период 2021–2025 гг. Экстракцию РНК SARS-CoV-2 проводили методом, основанным на сорбции РНК на магнитных частицах. Выделенную РНК использовали для получения кДНК с помощью реакции обратной транскрипции и последующей ПЦР. Для амплификации участков nsp5 вируса SARS-CoV-2 использовали следующую пару праймеров: 5' – ATAAGTACAAGTATTTAG TGG – 3' и 5' – GCAGACATAGCAATAATACC – 3'. Специфический ПЦР продукт участка гена nsp5 вируса SARS-CoV-2 составил 1234 пар нуклеотидов. Полученный ампликон предварительно очищенный ферментативным методом, подготовили к секвенирующей ПЦР. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе серии 3500 (Applied Biosystems, США). Анализ последовательностей участка nsp5 SARS-CoV-2 проводили в Sequencing Analysis Software v5.1.1 (Applied Biosystems, США); выравнивание и просмотр последовательностей выполняли в BioEdit v7.0.9.0. Экспортированные последовательности загружали для дальнейшей идентификации замен в nsp5 участке вируса SARS-CoV-2 на электронный ресурс <https://covdb.stanford.edu/drms/3clpro>.

Расчет абсолютных и относительных значений выполнялся с использованием методов описательной статистики. Для сравнения между вариантами и заменами использовался критерий χ^2 Пирсона. Тесты считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Анализ проводился с использованием R версии 4.4.1.

Результаты и их обсуждение. Был выполнен анализ 317 последовательностей участка генома nsp5 вируса SARS-CoV-2, позволивший установить профиль и частоту встречаемости мутаций, определяющих неэффективность препаратов ингибиторов протеазы: нирматрелвир (Paxlovid) и энситрелвир (Xosova). Среди которых мутации были обнаружены в 290 последовательностях ($91,5 \pm 2,1$ %) и в 27 последовательностях мутаций не было обнаружено ($8,5 \pm 1,6$ %). Основная мутация, характерная для данного участка генома вируса SARS-CoV-2, является P132H, которая присутствует в 287 последовательностях ($90,5 \pm 1,6$ %), среди которых имеется еще по одной дополнительной замене ($5,1 \pm 1,2$ %, $n = 16$). К таким относятся: K90R + P132H ($0,9 \pm 0,5$ %, $n = 3$), M171 + P132H, S81F + P132H и P132H + P241L ($0,6 \pm 0,4$ %, $n = 2$ для каждой пары); M17V + P132H, T45N + P132H, M82I + P132H, K88R + P132H, P132H + L208M, P132H + M235K и P132H + G251R ($0,3 \pm 0,3$ %, $n = 1$ для каждой пары). Также в исследуемой выборке последовательностей в единичных случаях присутствовали одиночные замены: K90R, A234T, V303I ($0,3 \pm 0,3$ %). Распределение вариантов вируса SARS-CoV-2 среди образцов, секвенированных по участку nsp5, показано в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение вариантов SARS-CoV-2 внутри наиболее представленных сублиний, циркулировавших в Республике Беларусь

Название сублинии	Кол-во	Доминирующий вариант Pango	Остальные варианты Pango
Вариант Омикрон BA.5	86	BA.5.2 – 86 % ($n = 74$)	BF.7 – 10,5 % ($n = 9$); BA.5 – 2,3 % ($n = 2$); BF.40 – 1,2 % ($n = 1$)
Рекомбинантная форма варианта Омикрон ХВВ.1.16	45	ХВВ.1.16.11 – 55,6 % ($n = 25$)	ХВВ.1.16 – 20 % ($n = 9$); ХВВ.1.16.15 – 20 % ($n = 9$); ХВВ.1.16.28 – 4,4 % ($n = 2$)
Рекомбинантная форма варианта Омикрон	44	FY.5.5.1 – 45,5 % ($n = 20$)	FY.5.1.1 – 43,2 % ($n = 19$); ХВВ.1.42.1 – 9,1 % ($n = 4$); ХВВ.2.9 – 2,3 % ($n = 1$)

Название сублинии	Кол-во	Доминирующий вариант Pango	Остальные варианты Pango
Рекомбинантная форма варианта Омикрон ХВВ.2.3	22	GE.1 – 63,6 % (n = 14)	JU.1; ХВВ.2.3.8; GE.1.2; JY.1; ХВВ.2.3.4 – 22,8 % (n = 5); GJ.1.2.2 – 13,6 % (n = 3)
Вариант Омикрон KP.2	22	KP.2.3 – 90,9 % (n = 20)	KP.2; KP.2.2 – 9,1 % (n = 2)
Вариант Альфа	14	B.1.1.7 – 100 %	–
Рекомбинантная форма варианта Омикрон ХВВ.1.9	12	FL.1.5.1 – 33,3 % (n = 4)	FL.24 – 8,3 % (n = 1); FL.24.1 – 33,3 % (n = 4); FL.13.4.1 – 16,7 % (n = 2); FL.14 – 8,3 % (n = 1)
Вариант Омикрон JN.1	11	JN.1 – 63,6 % (n = 7)	JN.1.34; MA.1.2; LB.1.3.1; JN.1.18 – 36,4 % (n = 4)
Вариант Дельта	10	AY.122 – 100 %	–
Рекомбинантная форма варианта Омикрон EG.5.1	10	EG.5.1.1 – 50 % (n = 5)	EG.5.1.4 – 30 % (n = 3); EG.5.1.6; JG.1 – 20 % (n = 2)
Вариант Омикрон LF.7	8	LF.7.7.2 – 62,5 % (n = 5)	LF.7.1.3 – 37,5 % (n = 3)
Вариант Омикрон BA.2	7	BA.2 – 71,4 % (n = 5)	BA.2.9.3; BA.2.12.1 – 28,6 % (n = 2)
Сублинии B.1	6	B.1 – 50 % (n = 3)	B.1.1.374 – 33,3 % (n = 2); B.1.1.523 – 16,7 % (n = 1)
Рекомбинантная форма варианта Омикрон ХВВ.1.5	5	ХВВ.1.5.28 – 60 % (n = 3)	HZ.2; ХВВ.1.5.10 – 40 % (n = 2)
Рекомбинантная форма варианта Омикрон НК.3	3	НК.3 – 100 %	–
Вариант Омикрон BA.4	3	BA.4.6 – 100 %	–
Вариант Омикрон KP.3	3	KP.3.1.1 – 66,7 % (n = 2)	KP.3.2 – 33,3 % (n = 1)
Вариант Омикрон BA.1	3	BA.1 – 66,7 % (n = 2)	BA.1.1 – 33,3 % (n = 1)
Вариант Омикрон LP.8.1.1	2	LP.8.1.1 – 100 %	–
Рекомбинант	1	XEF – 100 %	–

Полученная выборка характеризуется преобладающим количеством варианта BA.5.2, которая остается абсолютным лидером внутри своей сублинии – 86 % всех BA.5 образцов и 23 % от всей выборки. Среди рекомбинантных форм Омикрона ХВВ сублинии FY.5 демонстрируют равномерное распределение FY.5.1.1 и FY.5.5.1 – приблизительно 46 и 43 % соответственно. Подобная картина наблюдалась внутри сублинии ХВВ.1.16, где доля ведущей сублинии (ХВВ.1.16.11) составляет 56 %, а оставшаяся часть распределена между близкими ответвлениями. Рекомбинантные формы ХВВ.2.3 и EG.5 демонстрируют мозаичное распределение, где доля лидера (GE.1/EG.5.1.1) не превышает 65 %, остальные 35–50 % распределены между 4-6 менее распространенными сублиниями.

Сравнительный анализ замен в участке *nsr5* среди различных сублиний SARS-CoV-2 представлен на тепловой карте (рисунок 1), которая наглядно показывает, что сублинии B.1, варианты Альфа и Дельта (n = 30) не имели замену P132H, ставшую характерной для вариантов Омикрон начиная с BA.1 и до его рекомбинантных форм. Это предполагает положительный отбор, следовательно, наблюдаемая корреляция отражает последовательную смену доминирующих сублиний в популяции вируса. Это подтверждено на основе тестирования χ^2 Пирсона (распределена ли замена P132H случайно между сублиниями или же ассоциирована с ними). P132H ассоциирована с конкретными сублиниями вируса: варианты Омикрон и его сублинии (p < 0,05). Это подтверждает, что мутация P132H не случайна, а эволюционно закреплена, что также согласуется с данными в других проведенных исследованиях [3].

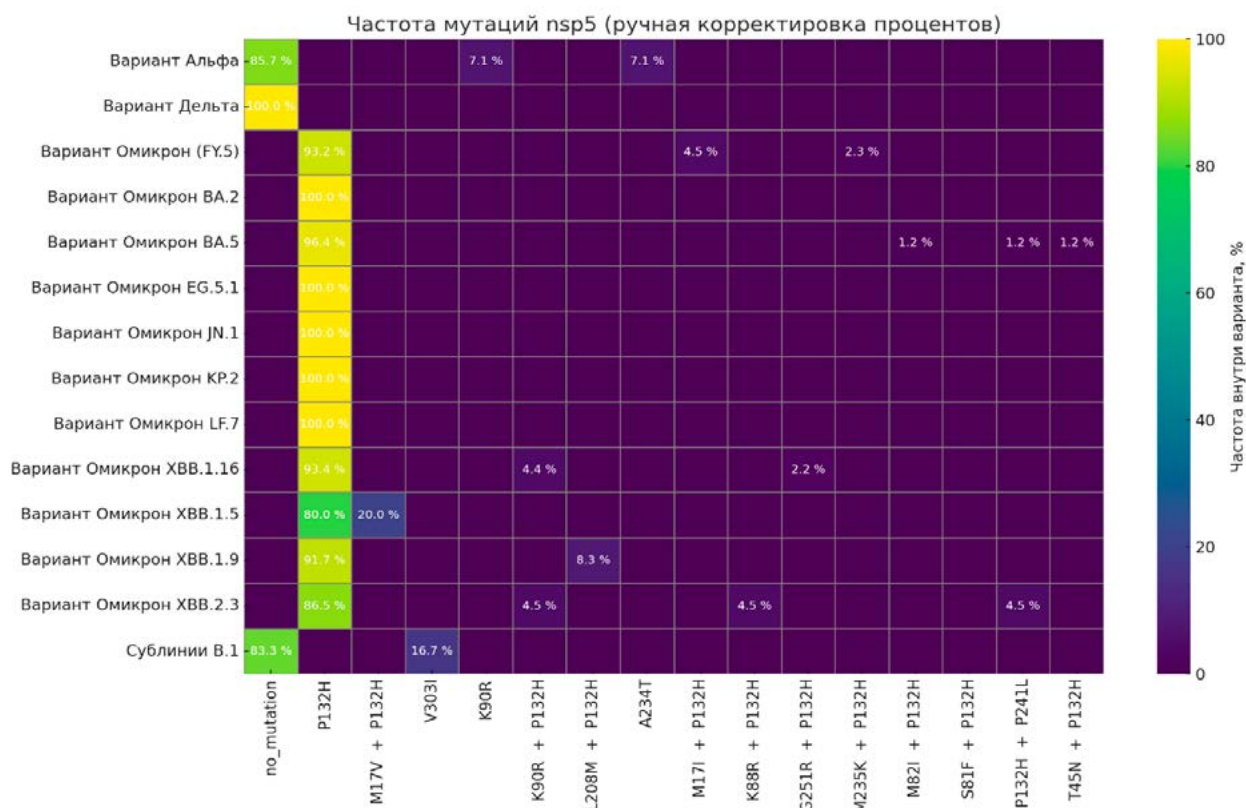


Рисунок 1 – Тепловая карта распределения частот замен в участке nsp5 сублиний вируса SARS-CoV-2, циркулирующих в Республике Беларусь в период 2021–2025 гг.

В первой половине 2021 г. в Беларуси зафиксированы лишь три изолированных случая точечных мутаций в nsp5. Замена A234T была обнаружена в апреле 2021 г. в образце варианта Альфа, и осталась эпизодической и не передалась дальше. Замена K90R обнаружена в мае 2021 г., также у варианта Альфа. Замена V303I зафиксирована в июне 2021 г. в B.1.1.523, являющемся вариантом под наблюдением в исследуемый период. Эта замена оставалась редкой и не имела эпидемиологического значения. После конца 2021 г. центральной стала мутация P132H, характерная для варианта Омикрон. Вокруг нее начали возникать дополнительные замены, потенциально способные влиять на устойчивость к противовирусным препаратам. Сочетание K90R + P132H (ранее встречавшееся в варианте Альфа) с ноября по декабрь 2023 г. трижды выявлялось в рекомбинантных формах XBB.1.16.11 (n = 2) и GE.1.2 (n = 1). Замены M17I + P132H (октябрь и ноябрь 2023 г., n = 2) находились в сублинии FY.5.5.1. Замена M17I лежит в N-конце протеазы и может влиять на димеризацию фермента, однако достоверной информации не представлено. S81F в сочетании с P132H встречались дважды в начале 2025 г. в сублинии LP.8.1.1. Замена S81F расположена близ активного центра. Данная сублиния является новой, поэтому фенотипические тесты на действие ингибиторов протеазы еще не опубликованы. Комбинация замен P132H + P241L впервые зафиксирована в летней волне BA.5.2 (июль 2022 г.), затем – в JY.1 (декабрь 2023 г.). Единичные случаи представлены: M17V + P132H в XBB.1.5.28 (ноябрь 2023 г.), T45N + P132H и M82I + P132H – по одному образцу сублинии BA.5.2 летом 2022 г. Замены K88R, L208M, M235K и G251R в сочетании с P132H также встречались единожды в образцах рекомбинантных вариантов Омикрон (GE.1, FL.24.1, FY.5.5.1, XBB.1.16.11 соответственно) – все четыре впервые встречались в конце 2023 г.

Исходя из списка замен в участке nsp5 вируса SARS-CoV-2, интерес представляют замены, которые потенциально могут приводить к развитию резистентности. В данном случае замена T45N, может обладать схожим эффектом с T45I. Эта позиция участвует в поддержании структурной стабильности и может влиять на конформацию субстратного кармана фермента. Многие исследования указывают, что замена T45I снижает эффективность ингибитора (нирматрелвира), но не приводит к полной резистентности [8]. Замена T45N может в некоторой степени быть функционально схожа с T45I. Учитывая, что позиция 45 не входит прямо в активный сайт фермента, обе замены (I и N) оказывают косвенное влияние через

изменение структуры, но по взаимодействию – вероятно, менее эффективно вызывает резистентность к энцитрелвиру и нирматрелвиру, оказывая незначительное влияние на устойчивость.

Заключение. Проведенное частичное секвенирование участка *nsp5*, кодирующего протеазу SARS-CoV-2, и последующий биоинформационный анализ 317 последовательностей вируса SARS-CoV-2 позволили охарактеризовать мутационный профиль, потенциально влияющий на эффективность ингибиторов протеазы. Мутации *nsp5* обнаружены в 91,5 % образцах, остальные образцы, относящиеся к сублинии В.1, варианту Альфа и Дельта сохранили последовательность как в «уханьском» варианте. Замена P132H зафиксирована в 90,5 % выборки и демонстрирует сильнейшую ассоциацию с сублиниями варианта Омикрон ($p < 0,05$), что указывает на эволюционную фиксацию этой замены в популяции вируса. Одиночные замены (A234T, V303I) выявлены в ранних вариантах вируса, ныне не присутствующих на территории страны и не имеющих эпидемиологического значения. С конца 2021 г. с мутацией P132H начали накапливаться дополнительные аминокислотные замены, которые чаще всего встречались в сублиниях FY.5 с профилем M17I + P132H и в сублинии ХВВ.1.16, среди которых дважды идентифицировано сочетание K90R + P132H. Выявленные дополнительные замены располагаются вне каталитической зоны протеазы (такие как T45N, M17I/V, G251R, V303I, P241L) могут рассматриваться как возможные маркеры начальной адаптации вируса к терапии ингибиторами протеазы.

За пятилетний период был изучен профиль мутаций в участке *nsp5* вируса SARS-CoV-2 у генетических вариантов вируса SARS-CoV-2, доминировавших в разные периоды пандемии: сублинии В.1, Альфа, Дельта, Омикрон и его сублинии, а также рекомбинантные формы варианта Омикрон. Обнаруженные замены в участке *nsp5* могут потенциально снижать эффективность ингибиторов протеазы, однако подтвержденной генотипической резистентности к нирматрелвиру и энцитрелвиру не выявлено, что указывает на целесообразность их дальнейшего применения. Формирование комбинаций новых замен подчеркивает необходимость постоянного молекулярного надзора за участком *nsp5* вируса SARS-CoV-2.

Сведения о НИР. НИР «Изучить влияние мутаций лекарственной устойчивости вируса SARS-CoV-2 на течение заболевания и эффективность применения средств противовирусного действия для лечения COVID-19 в отношении актуальных штаммов вируса и разработать алгоритм молекулярно-генетических исследований для их выявления», регистрационный номер 20230286.

Литература

1. Oral Nirmatrelvir and Ritonavir for coronavirus disease 2019 in vaccinated, nonhospitalized adults aged 18–50 years / J. S. Faust, A. Kumar, J. Shah [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2023. – Vol. 77, iss. 9. – P. 1257–1264. – DOI: 10.1093/cid/ciad400.
2. Genetic surveillance of SARS-CoV-2 M^{pro} reveals high sequence and structural conservation prior to the introduction of protease inhibitor Paxlovid / J. T. Lee, Q. Yang, A. Gribenko [et al.] // mBio. – 2022. – Vol. 13, № 4. – Art. № e00869-22. – DOI: 10.1128/mbio.00869-22.
3. SARS-CoV-2 M^{pro} protease variants of concern display altered viral substrate and cell host target galectin-8 processing but retain sensitivity toward antivirals / S. A. Chen, E. Arutyunova, J. Lu [et al.] // ACS Cent. Sci. – 2023. – Vol. 9, iss. 4. – P. 696–708. – DOI: 10.1021/acscentsci.3c00054.
4. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir / S. Iketani, H. Mohri, B. Culbertson [et al.] // Nature. – 2023. – Vol. 613, № 7944. – P. 558–564. – DOI: 10.1038/s41586-022-05514-2.
5. The substitutions L50F, E166A, and L167F in SARS-CoV-2 3CL^{pro} are selected by a protease inhibitor *in vitro* and confer resistance to Nirmatrelvir / D. Jochmans, C. Liu, K. Donckers [et al.] // mBio. – 2023. – Vol. 14, № 1. – Art. № e0281522. – DOI: 10.1128/mbio.02815-22.
6. Structural basis of nirmatrelvir and ensitrelvir activity against naturally occurring polymorphisms of the SARS-CoV-2 main protease / G. D. Noske, E. De Souza Silva, M. O. De Godoy [et al.] // J. Biol. Chem. – 2023. – Vol. 299, № 3. – Art. № 103004. – DOI: 10.1016/j.jbc.2023.103004.
7. Structural basis for varying drug resistance of SARS-CoV-2 M^{pro} E166 variants / M. A. Esler, K. Shi, J. A. Rollie [et al.] // mBio. – 2025. – Vol. 16, № 7. – Art. № e0262424. – DOI: 10.1128/mbio.02624-24.
8. Transmissible SARS-CoV-2 variants with resistance to clinical protease inhibitors / S. A. Moghadas, E. Heilmann, A. M. Khalil [et al.] // Sci. Adv. – 2023. – Vol. 9, № 3. – Art. № eade8778. – DOI: 10.1126/sciadv.ade8778.
9. In vitro and in vivo characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir / M. Kiso, S. Yamayoshi, S. Iida [et al.] // Nat. Commun. – 2023. – Vol. 14, № 1. – Art. № 4231. – DOI: 10.1038/s41467-023-40018-1.

10. Evaluation of the inhibition potency of Nirmatrelvir against main protease mutants of SARS-CoV-2 variants / H. Jiang, Y. Zhou, X. Zou [et al.] // *Biochemistry*. – 2023. – Vol. 62, № 13. – P. 2055–2064. – DOI: 10.1021/acs.biochem.3c00075.

11. Evaluation of antiviral drugs against newly emerged SARS-CoV-2 Omicron subvariants / J. Cho, Y. Shin, J.-S. Yang [et al.] // *Antiviral Res.* – 2023. – Vol. 214 – Art. № 105609. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105609.

Bulda K. Y., Kosko A. D., Gasich E. L., Dorofeeva E. A.¹, Karpov I. A.¹

MUTATIONAL PROFILE OF THE SARS-COV-2 NSP5 REGION ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS

State institution «Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health», Minsk, Belarus

¹Educational institution «Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus

The study of SARS-CoV-2 genome mutations is crucial for understanding the mechanisms underlying the development of resistance to antiviral therapy. The aim of this work was to characterize the mutational profile of the nsp5 region of the SARS-CoV-2 genome and to assess genotypic resistance to main protease inhibitors in clinical samples of SARS-CoV-2 variants. A total of 317 nsp5 sequences of SARS-CoV-2 were collected in Belarus between 2021 and 2025. Mutations were identified in 91.5 % of sequences, with P132H being the predominant substitution, detected in 90.5 % of samples and statistically associated with Omicron lineages. Additional rare substitutions (M171/V, T45N, K90R, P241L, etc.) were frequently observed in combination with P132H, whereas early sporadic mutations (A234T, V303I) were found in B.1 and Alpha lineages. The detected substitutions may potentially reduce the effectiveness of protease inhibitors; however, no confirmed genotypic resistance to nirmatrelvir or ensitrelvir was identified. These findings highlight the need for continuous molecular surveillance to monitor resistance.

Keywords: protease, SARS-CoV-2, sequencing, resistance.

References

1. Faust J.S., Kumar A., Shah J. et al. Oral Nirmatrelvir and Ritonavir for coronavirus disease 2019 in vaccinated, nonhospitalized adults aged 18–50 years. *Clin Infect Dis.* 2023; 77(9): 1257–64. DOI: 10.1093/cid/ciad400.

2. Lee J.T., Yang Q., Gribenko A. et al. Genetic surveillance of SARS-CoV-2 Mpro reveals high sequence and structural conservation prior to the introduction of protease inhibitor Paxlovid. *mBio.* 2022; 13(4): e00869-22. DOI: 10.1128/mbio.00869-22.

3. Chen S.A., Arutyunova E., Lu J. et al. SARS-CoV-2 Mpro protease variants of concern display altered viral substrate and cell host target galectin-8 processing but retain sensitivity toward antivirals. *ACS Cent Sci.* 2023; 9(4): 696–708. DOI: 10.1021/acscentsci.3c00054.

4. Iketani S., Mohri H., Culbertson B. et al. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature.* 2023; 613(7944): 558–64. DOI: 10.1038/s41586-022-05514-2.

5. Jochmans D., Liu C., Donckers K. et al. The substitutions L50F, E166A, and L167F in SARS-CoV-2 3CLpro are selected by a protease inhibitor in vitro and confer resistance to Nirmatrelvir. *mBio.* 2023; 14(1): e0281522. DOI: 10.1128/mbio.02815-22.

6. Noske G.D., De Souza Silva E., De Godoy M.O. et al. Structural basis of nirmatrelvir and ensitrelvir activity against naturally occurring polymorphisms of the SARS-CoV-2 main protease. *J Biol Chem.* 2023; 299(3): 103004. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.103004.

7. Esler M.A., Shi K., Rollie J.A. et al. Structural basis for varying drug resistance of SARS-CoV-2 Mpro E166 variants. *mBio.* 2025; 16(7): e02624-24. DOI: 10.1128/mbio.02624-24.

8. Moghadasi S.A., Heilmann E., Khalil A.M. et al. Transmissible SARS-CoV-2 variants with resistance to clinical protease inhibitors. *Sci Adv.* 2023; 9(13): eade8778. DOI: 10.1126/sciadv.ade8778.

9. Kiso M., Yamayoshi S., Iida S. et al. In vitro and in vivo characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir. *Nat Commun.* 2023; 14(1): 4231. DOI: 10.1038/s41467-023-40018-1.

10. Jiang H., Zhou Y., Zou X. et al. Evaluation of the inhibition potency of Nirmatrelvir against main protease mutants of SARS-CoV-2 variants. *Biochemistry.* 2023; 62(13): 2055–64. DOI: 10.1021/acs.biochem.3c00075.

11. Cho J., Shin Y., Yang J.S. et al. Evaluation of antiviral drugs against newly emerged SARS-CoV-2 Omicron subvariants. *Antiviral Res.* 2023; 214: 105609. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105609.

e-mail для переписки: hivlab@belriem.by

Поступила 15.09.2025

ISSN 2076-3778

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»

ЗДОРОВЬЕ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА

Сборник научных трудов

Выпуск 35

Гомель
Редакция газеты «Гомельская праўда»
2025