

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

на правах рукописи

Рудометова Надежда Борисовна

**Конструирование псевдовирюсов рекомбинантной формы CRF63_02A и
подтипа A6 ВИЧ-1 и их использование для поиска ингибиторов
проникновения вируса в клетку-мишень**

1.5.3 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Щербаков Дмитрий Николаевич

Кольцово – 2021

Оглавление

Список используемых сокращений.....	4
Введение.....	5
ГЛАВА 1. СПОСОБЫ БОРЬБЫ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ВИЧ-1 <i>IN VITRO</i>	11
1.1 Общая характеристика ВИЧ-1	11
1.2 Антитретровирусная терапия	15
1.3 Широконейтрализующие антитела и вакцины	29
1.4 Методы оценки эффективности вакцин и химиотерапевтических препаратов <i>in vitro</i> . Изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1.....	33
1.5 Инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1	35
1.6 Технология псевдовирюсов	36
1.7 Заключение	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы.....	45
2.2 Методы	48
2.2.1 Выделение РНК ВИЧ-1.....	48
2.2.2 Обратная транскрипция.....	48
2.2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	49
2.2.4 Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля	50
2.2.5 Клонирование гена <i>env</i> ВИЧ-1.....	50
2.2.6 Трансформация компетентных клеток <i>E.coli</i> NEB Stable методом heat-shock.....	50
2.2.7 Скрининг колоний.....	51
2.2.8 Выделение плазмидной ДНК.....	51
2.2.9 Трансфекция культуры клеток HEK293	51
2.2.10 Определение функциональной активности псевдовирюсов на культуре клеток TZM-bl.....	53
2.2.11 Определение TCID ₅₀ псевдовирюсов ВИЧ-1	53
2.2.12 Анализ вируснейтрализации с использованием <i>env</i> -псевдовирюсов ВИЧ-1.....	54
2.2.13 Секвенирование.....	54

2.2.14 Филогенетический анализ	55
2.2.15 Анализ мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам...	55
2.2.16 Определение тропности к ко-рецептору	55
2.2.17 Определение цитотоксичности соединений методом МТТ-теста	56
2.2.18 Исследование эффективности ингибиторов в зависимости от момента их добавления к инфицированным псевдовиром клеткам.....	57
2.2.19 Статистический анализ результатов	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1 Получение <i>env</i> -псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Западной Сибири	59
3.1.1 Анализ генетического разнообразия изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Западной Сибири	59
3.2 Амплификация гена <i>env</i> и его клонирование в составе экспрессионного вектора	64
3.2 Использование псевдовирусов ВИЧ-1 для поиска соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ	93
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	95
Приложение 1	123

Список используемых сокращений

а. о. – аминокислотный остаток

АРП – антиретровирусные препараты

АРТ – антиретровирусная терапия

ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ВИК – вирус иммунодефицита кошек

ВИО – вирус иммунодефицита обезьян

ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ингибиторы интегразы

ИМК – инфекционные молекулярные клоны

ИП – ингибиторы протеазы

МКПК – моноклеарные клетки периферической крови

НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ – не-нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ОП – оптическая плотность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ФГА – фитогемагглютинин

bnAbs – broadly neutralizing antibodies (широконейтрализующие антитела)

BSL-2 – biosafety level 2 (уровень биобезопасности 2)

ECL – extracellular loops of CCR5 (внеклеточная петля)

IC50 – inhibitory concentration of 50% (50% ингибирующая концентрация)

LTR – long terminal repeat (длинный концевой повтор)

MPER – membrane-proximal external region (мембрано-проксимальная наружная область gp41)

SI – selectivity index (индекс селективности)

VSV – vesicular stomatitis virus (вирус везикулярного стоматита)

Введение

Несмотря на значительные достижения в области лечения и профилактики ВИЧ-инфекции за последние десятилетия, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) остается важной и сложной проблемой мирового здравоохранения. По официальным данным, опубликованным в 2020 году, в мире насчитывается более 38 миллионов ВИЧ-инфицированных людей, из них на долю РФ приходится более 1,4 миллионов человек. По темпам заболеваемости ВИЧ-инфекцией Российская Федерация занимает первое место среди стран Европы и Средней Азии (ВОЗ, 2020).

На данный момент, основным методом лечения ВИЧ-инфекции является применение антиретровирусной терапии, главная цель которой – максимально подавить вирусную нагрузку у пациента, сохранить иммунологические функции организма и снизить риск передачи вируса (Phanuphak, Gulick, 2020).

Одним из перспективных классов препаратов являются ингибиторы проникновения, чей механизм действия обусловлен препятствием проникновения вируса в клетку-мишень. Блокирование данного этапа имеет ряд преимуществ по сравнению с блокированием других этапов жизненного цикла ВИЧ-1. Во-первых, вирус блокируется до того, как вирусный геном интегрируется в геном клетки-хозяина, что предотвращает создание латентных резервуаров вируса. Во-вторых, ингибиторам проникновения нет необходимости проникать в клетки, в отличие от ингибиторов обратной транскриптазы, интегразы и протеазы. В-третьих, процесс входа состоит из отдельных этапов, каждый из которых может быть ингибирован, предлагая несколько мишеней для ингибиторов проникновения, которые не должны проявлять перекрестной устойчивости (Phanuphak, Gulick, 2020).

В настоящее время, в работах, связанных с оценкой гуморального иммунного ответа против ВИЧ-1, возникающего в ответ на вакцинные конструкции, и скрининга потенциальных химиотерапевтических агентов, а именно ингибиторов проникновения, наилучшим образом себя

зарекомендовала технология *env*-псевдовирусов. По сравнению с первичными изолятами ВИЧ-1, работа с псевдовирусами может проводиться в лабораториях уровня биобезопасности BSL-2, что значительно удешевляет и упрощает эксперименты. Кроме того, структура поверхностного белка Env ВИЧ-1 на поверхности псевдовирусов идентична структуре поверхностных гликопротеинов нативного вируса. Наконец, главным достоинством данной технологии является возможность получения широкой панели псевдовирусов, экспонирующих поверхностные белки множества вирусных подтипов, тем самым обеспечивая высокий уровень воспроизводимости результатов с учетом генетического разнообразия штаммов вируса в каждом конкретном регионе мира (Li et al., 2017; Montefiori et al., 2017). На сегодняшний день сконструировано более 100 штаммов псевдотипированных вирусов ВИЧ-1, которые используются научными группами, занимающимися разработкой вакцин и химиопрепаратов по всему миру. Однако доступные в настоящее время псевдовирусы не являются репрезентативными для распространенных в РФ подтипов и рекомбинантных форм. Согласно недавнему отчету, в большинстве федеральных округов РФ доминирует подтип А6, при этом на территории Сибирского федерального округа развитие эпидемии определяет генетический вариант CRF63_02A ВИЧ-1. Поэтому необходимо проводить постоянную работу, направленную на получение новых вариантов псевдовирусов на основе актуальных циркулирующих штаммов ВИЧ-1.

Таким образом, **целью исследования** является конструирование *env*-псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации, в частности Сибирского федерального округа, и их использование для скрининга соединений, блокирующих проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень.

Задачи исследования

- 1) Провести каталогизацию образцов сывороток ВИЧ-инфицированных доноров, полученных из региональных центров СПИД.

- 2) Провести анализ гена *pol* для определения генетического разнообразия изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа.
- 3) Получить и охарактеризовать молекулярно-клонированные *env*-псевдовirusы на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в Сибирском федеральном округе.
- 4) Провести анализ антивирусной активности библиотеки соединений на основе терпеноидов с использованием сконструированных *env*-псевдовirusов ВИЧ-1 и выявить классы производных терпеноидов, проявляющих антивирусную активность в отношении *env*-псевдовirusов ВИЧ-1.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе исследования проведена комплексная характеристика образцов сывороток, полученных из Центров по профилактике и борьбе со СПИД в период с 2016 по 2020 годы.

Исследовано генетическое разнообразие вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа. Показано, что в Новосибирской и Кемеровской областях, Алтайском крае и Республике Хакасия продолжает доминировать рекомбинантная форма CRF63_02A. Впервые показано, что в Республике Алтай более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу A6, на долю рекомбинантной формы CRF63_02A приходится менее 30%.

Получены данные о мутациях устойчивости к антиретровирусным препаратам. Установлено, что в области протеазы большинство исследованных образцов содержат полиморфные мутации K20I, L10I/V и V11I. В сегменте обратной транскриптазы выявлены мутации резистентности к нуклеозидным (M41L и K65R) и не-нуклеозидным (K103N) ингибиторам обратной транскриптазы.

В GenBank депонировано 55 нуклеотидных последовательностей области *pol* под номерами доступа – MT101799-MT101834 и MT811096-MT811114.

Получено и охарактеризовано 13 псевдовирусов на основе рекомбинантной формы CRF63_02A и подтипа A6.

Отработана технология скрининга производных терпеноидов с использованием полученных *env*-псевдовирусов ВИЧ-1. Показано, что наиболее высоким ингибирующим потенциалом в отношении псевдовирусов ВИЧ-1 обладают триникотинаты глицирризиновой кислоты, что дает возможность рассматривать данный препарат в качестве перспективного фармакологически активного соединения для дальнейших исследований.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Доминирующим генетическим подтипом в Новосибирской и Кемеровской областях, Алтайском крае и Республике Хакасия является рекомбинантная форма CRF63_02A. На территории Республики Алтай более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу A6.

2. В аминокислотных последовательностях протеазы ВИЧ-1 выявлены полиморфные мутации K20I, L10I/V и V11I. В сегменте обратной транскриптазы выявлены мутации резистентности к нуклеозидным (M41L и K65R) и не-нуклеозидным (K103N) ингибиторам обратной транскриптазы.

3. Полученные и охарактеризованные в данной работе *env*-псевдовирусы на основе рекомбинантной формы CRF63_02A и подтипа A6 могут быть использованы для скрининга соединений, способных блокировать проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень, и анализа вируснейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных экспериментальными анти-ВИЧ-1 иммуногенами.

4. Производное адамантана – N-(2-адамантил)-N-(2-п-бромфенил)амин обладает ингибирующими свойствами против псевдовирусов, включенных в международную панель – SF162.LS (IC₅₀=69,5 мкМ и SI=4,3), ON0692

(IC₅₀=59,8 мкМ и SI=5), и полученных в данной работе - 16RU54 (IC₅₀=91,9 мкМ и SI=3,3).

5. Препарат, который является триникотинатом глицирризиновой кислоты, показал хорошую противовирусную активность против псевдовируса SF162.LS (IC₅₀<3.9 мкМ и SI=244) и псевдовируса 16RU28 (IC₅₀=6.91 мкМ и SI=138).

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационной работы отражены в 20 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 4 статьи – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 15 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Результаты работы были представлены на различных научных конференциях, в том числе: VI Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (победитель постерной сессии, г. Санкт-Петербург, 2020 г.); VI Международной научной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2019 г.); V Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (диплом за I место в секции биотехнология, Кольцово, 2018 г.); V Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (победитель постерной сессии, г. Новосибирск, 2018 г.); IV Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Кольцово, 2017 г.).

Личный вклад автора

Основные результаты, представленные в диссертационной работе, получены автором лично. Депонирование нуклеотидных последовательностей, построение филогенетических деревьев, поиск и анализ мутаций, содержащихся во фрагментах гена *pol*, проводились лично автором и совместно с Мигелем Томсоном (Институт здоровья им. Карлоса III, Мадрид, Испания). Секвенирование нуклеотидных последовательностей было

проведено в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ, Новосибирск). Работа выполнена в 2016–2020 гг.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 127 страницах, включает 26 рисунков, 10 таблиц, 1 приложение. Список литературы включает 248 источников.

ГЛАВА 1. СПОСОБЫ БОРЬБЫ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ВИЧ-1 *IN VITRO*

Целью данного литературного обзора является представление современного состояния о способах лечения ВИЧ-инфекции и методах оценки эффективности вакцин и лекарственных препаратов против ВИЧ-1 *in vitro*. Вначале обзора приводится краткая информация о морфологии и жизненном цикле ВИЧ-1, затем рассматриваются методы борьбы с ВИЧ-инфекцией, применяемые в настоящее время, а именно антиретровирусная терапия, вакцины и антитела. После этого подробно рассмотрен вопрос, касающийся использования репликационно-компетентных изолятов вируса и псевдовиральной системы для анализа нейтрализации и оценки эффективности вакцинных и химиотерапевтических препаратов против ВИЧ *in vitro*.

1.1 Общая характеристика ВИЧ-1

Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) является одним из наиболее изученных вирусов в связи с его повсеместным распространением и угрозой, которую он несет. Данный вирус входит в род *Lentivirus*, семейство *Retroviridae*, и является оболочечным вирусом с РНК геномом. Заболевание, обусловленное лентивирусами, характеризуется длительным латентным периодом между инфекцией и началом заболевания, которое длится обычно от восьми до двенадцати лет (Engelman, Cherepanov, 2012; Swanstrom, Coffin, 2012).

Зрелая частица ВИЧ-1 (рисунок 1) имеет сферическую форму, диаметр которой составляет около 100 нм, и включает две копии одноцепочечной РНК и белки: обратную транскриптазу, протеазу и интегразу, которые заключены в капсид, образованный белком р24. Капсид окружен матриксом, состоящим из белка р17. Внешняя оболочка вириона состоит из липидного бислоя, полученного от клетки-хозяина, в которую погружены тримерные белковые гетеродимеры, называемые шипами оболочки или Env_s. Комплекс Env состоит

из трех копий трансмембранного гликопротеина gp41 и трех копий внешнего нековалентно связанного с ним – gp120 (Moore et al., 2006; Zhu et al., 2006; Klein, Bjorkman, 2010; Engelman, Cherepanov, 2012).

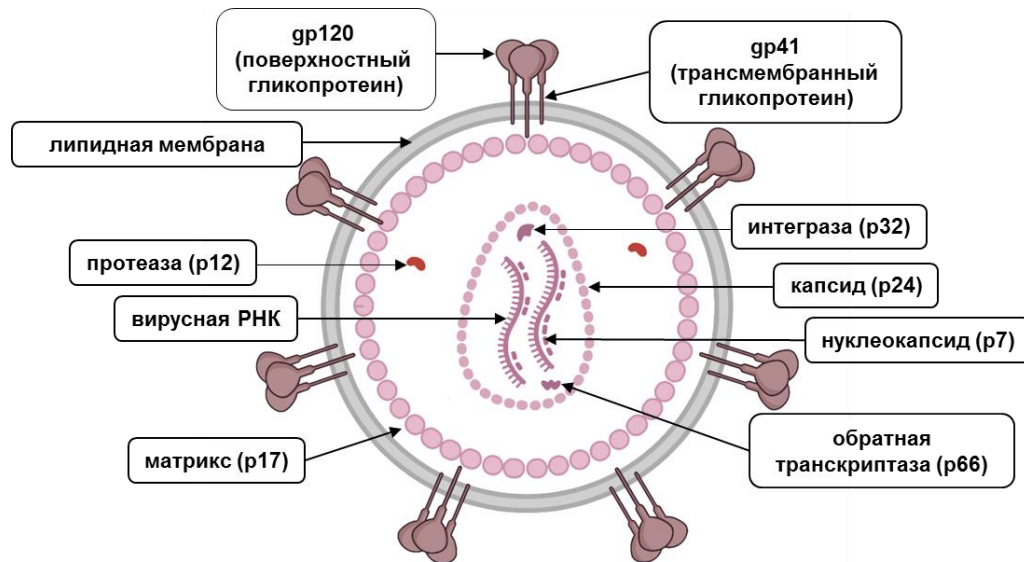


Рисунок 1 – Схематическое изображение вириона ВИЧ-1 (визуализировано с помощью онлайн-ресурса BioRender.com).

Геном провируса ВИЧ-1 (рисунок 2), также известный как провирусная ДНК, формируется в результате реакции обратной транскрипции вирусной РНК в молекулу ДНК, расщепления РНК-ДНК дуплекса и интеграции двухцепочечной ДНК ВИЧ в геном человека. Провирусная ДНК фланкирована с обоих концов последовательностями LTR (длинный концевой повтор). 5'LTR-область кодирует промотор для транскрипции вирусных генов. В направлении 5'-3' следует рамка считывания гена *gag*, кодирующая матриксный белок (МА, p17), капсидный белок (СА, p24), нуклеокапсид (NC, p7) и белок, стабилизирующий нуклеиновую кислоту. За рамкой считывания *gag* следует рамка считывания *pol*, кодирующая ферменты протеазу (PR, p12), обратную транскриптазу (RT, p51), РНКазу Н (p15) и интегразу (IN, p32). За рамкой считывания *pol* следует рамка считывания *env*, кодирующая белок gp160, расщепляемый клеточной эндопротеазой фурином на два гликопротеина оболочки gp120 (поверхностный белок) и gp41

(трансмембранный белок). В дополнение к структурным белкам геном ВИЧ кодирует несколько регуляторных белков: Tat (трансактиваторный белок) и Rev (сплайсинг-регулятор РНК), необходимые для инициации репликации ВИЧ, тогда как другие регуляторные белки Nef (отрицательный регулирующий фактор), Vif (фактор инфекционности вируса), Vpr (вирусный белок *г*) и Vpu (уникальный вирусный белок) влияют на репликацию, почкование и патогенез вируса (Sauter et al., 2012; Vicenzi, Poli, 2013; Foley et al., 2018).

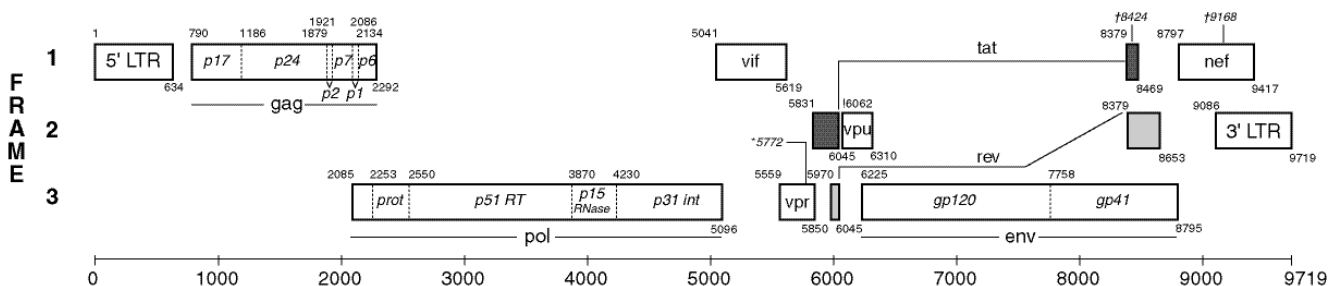


Рисунок 2 – Организация генома ВИЧ-1 на примере изолята HXB2 (Genebank: K03455) (HIV sequence database).

Жизненный цикл ВИЧ-1 состоит из нескольких стадий: адсорбция и проникновение вируса в клетку путем слияния мембран; высвобождение вирусной РНК; синтез ДНК-провируса и его интеграция в геном клетки хозяина; синтез РНК и белков дочерних вирионов; сборка и высвобождение вновь образованных дочерних вирионов из клетки путем почкования. Основным рецептором для ВИЧ-1 является CD4, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулин-подобных белков, представленный на поверхности субпопуляций Т-клеток и первичных макрофагов. Взаимодействия поверхностного гликопротеина с CD4 недостаточно для проникновения ВИЧ-1 в клетку-мишень. В качестве основных корецепторов ВИЧ-1 использует белки из группы хемокиновых рецепторов CCR5 или CXCR4 (семейство из семи трансмембранных G-связанных белков), которые мобилизуют внутриклеточный кальций и индуцируют хемотаксис лейкоцитов. В связи с этим, условно выделяют два больших класса ВИЧ-1: М-

тропные (макрофаги) с не-синцитиальной индукцией, использующие в качестве корецептора CCR5, и Т-тропные (Т-клетки) с синцитиальной индукцией, которые используют в качестве корецептора CXCR4. Наряду с М-тропными и Т-тропными штаммами также встречаются штаммы, использующие оба корецептора.

На основе филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей штаммов ВИЧ-1 была осуществлена их классификация, в результате чего были выделены группы, субтипы (подтипы), суб-субтипы (под-подтипы), циркулирующие рекомбинантные формы (CRFs, circulating recombinant form), а также уникальные рекомбинантные формы (URFs, unique recombinant forms). В настоящее время выделяют 4 группы (М, N, О и Р), 9 подтипов группы М (А, В, С, D, F, G, H, J и K) и несколько под-подтипов (например, А1, А2 для подтипа А и F1, F2 для подтипа F) (Robertson et al., 2000; Sharp, Hahn, 2011; Peeters et al., 2013; Désiré et al., 2018). На территории Российской Федерации подтипы и рекомбинантные формы ВИЧ-1 распределены следующим образом: на территориях Южного и Северо-Кавказского федеральных округов России обнаружены подтипы А, G и В ВИЧ-1, а также выделены циркулирующие рекомбинантные формы ВИЧ-1 – CRF02_AG, CRF02_AG/A и CRF03_AB (Гашникова и др., 2013); в Приволжском федеральном округе выявлена тенденция к доминированию подтипа А6 ВИЧ-1, вторым по частоте обнаружения является подтип В, установлено увеличение разнообразия генетических вариантов ВИЧ-1 за счет появления рекомбинантных вариантов АВ, AG, CRF06_cpx, CRF01_AE и изолята подтипа С (Зайцева и др., 2016); в Уральском регионе доминирует подтип А6 ВИЧ-1, в единичных случаях выделяются подтип В и URF63_A1 ВИЧ-1 (Конькова-Рейдман и др., 2016); на территории Сибирского федерального округа развитие эпидемии определяет генетический вариант CRF63_02A ВИЧ-1, затем подтип А6 ВИЧ-1, а также выявлены уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1, прародителями которых являются изоляты ВИЧ-1 подтипа А и CRF63_02A (Муранкина и др., 2016; Зырянова и др., 2020;

Казеннова и др., 2020); в большинстве регионов Дальневосточного федерального округа доминирует подтип А6, также были выявлены подтипы В и С; среди рекомбинантных форм ВИЧ-1 выявлены CRF03_AB, CRF02_AG, CRF63_02A, CRF11_cpx и CRF01_AE (Котова и др., 2019).

1.2 Антиретровирусная терапия

Основным методом лечения ВИЧ-инфекции в настоящее время является высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ). Главная цель антиретровирусной терапии – увеличить длительность активной жизни, посредством достижения максимального подавления вирусной нагрузки у пациента и сохранения иммунологических функций организма, а также снизить риск передачи вируса. В настоящее время существует более 30 антиретровирусных препаратов, которые одобрены для лечения ВИЧ-инфекции Управлением по контролю продуктами и лекарствами США (US Food and Drug Administration, FDA) (Phanuphak, Gulick, 2020). В Российской Федерации в 2018 году было зарегистрировано 35 препаратов для лечения ВИЧ-инфекции и 145 торговых наименований без учета различных дозировок и лекарственных форм (Коалиция по готовности к лечению, 2018).

Жизненный цикл ВИЧ-1 включает ряд этапов, воздействие на которые способно подавлять его жизнеспособность. В связи с этим, по механизму действия все антиретровирусные препараты разделяются на несколько фармакологических групп (таблица 1).

Мишенью первой и второй групп препаратов (НИОТ и ННИОТ) является вирус-специфичный фермент – обратная транскриптаза, которая представляет собой асимметричный гетеродимер, состоящий из двух связанных субъединиц, р66 и р51. Обе субъединицы формируются путем расщепления вирусной протеазой полипротеина Gag-Pol, который синтезируется из несплайсированной вирусной РНК. р66 имеет длину 560 аминокислот, р51 – длину 440 аминокислот.

Таблица 1 – Классы антиретровирусных препаратов

Класс препарата	Наименование препарата	Торговое наименование	Внедрение в клиническую практику (год)	Ссылка
Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ)	Азидотимидин (AZT)	Ретровир	1987	Mohsin et al., 2019
	Ставудин (D4T)	Зерит	1994	Knechten et al., 1998
	Эмтрицитабин (FTC)	Эмтрива	2003	Bang, Scott, 2003
	Ламивудин (3TC)	Эпивир	1995	Perry, Faulds, 1997
	Абакавир (ABC)	Зиаген	1998	Foster, Faulds, 1998
	Диданозин (ddI)	Видекс	1991	Faulds, Brogden, 1992
	Тенофовир дизопроксил фумарат (TDF)	Виреад	2001	Kearney et al., 2004
Не-нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ)	Невирапин (NVP)	Вирамун	1994	Mirochnick et al., 2000
	Делавирдин (DLV)	Рескриптор	1997	Scott, Perry, 2000
	Эфавиренц (EFV)	Сустива	1998	Adkins, Noble, 1998
	Этравирин (ETR)	Интеленс	2008	Schöller-Gyüre et al., 2009
	Рилпивирин (RPV)	Эдурант	2011	Molina et al., 2011
	Доравирин (DOR)	Пифельтро	2018	Colombier, Molina, 2018
Ингибиторы протеазы (ИП)	Саквинавир (INV)	Инвираза	1995	Noble, Faulds, 1996
	Индинавир (IDV)	Криксиван	1996	Plosker, Noble, 1999
	Ритонавир (RTV)	Норвир	1996	Hsu, 1998
Ингибиторы протеазы (ИП)	Нелфинавир (NFN)	Вирасепт	1997	Perry, Benfield, 1997
	Ампренавир (APV)	Агенераз	1999	Adkins, Faulds, 1998
	Фосампренавир (FPV)	Телзир	2007	Wire, 2006
	Лопинавир (LPV)	Калетра (LPV/RTV)	2000	Hurst, Faulds, 2000

Продолжение таблицы 1

Ингибиторы протеазы (ИП)	Атазанавир (ATV)	Реатаз	2003	Goldsmith, Perry, 2003
	Типранавир (TPV)	Аптивус	2005	Croom, Keam, 2005
	Дарунавир (DRV)	Презиста	2006	Ghosh, 2007
Ингибиторы интегразы (ИИ)	Долутегравир (DTG)	Тивикай	2013	Cottrell et al., 2013
	Ралтегравир (RAL)	Исентресс	2007	Temesgen, Siraj, 2008
Ингибиторы проникновения				
Ингибитор слияния	Энфувиртид (T20, ENF)	Фузеон	2003	Lalezari et al., 2003
Антагонист CCR5-корцептора	Маравирок (MVC)	Селзенстри	2007	Abel, 2009
Ингибитор CD4-рецептора	Ибализумаб (IBA)	Трогарзо	2018	Markham, 2018

Большая субъединица гетеродимера р66 содержит активные сайты для двух ферментативных активностей – ДНК-полимеразной, которая позволяет осуществлять построение ДНК по матрице РНК, и РНКазы Н, которая необходима для расщепления РНК-ДНК дуплекса; субъединица меньшего размера играет структурную роль (рисунок 3) (Sarafianos et al., 2009). Полимеразный домен состоит из четырех субдоменов: «пальцы» (а. о. 1–85 и 118–155), «ладонь» (а. о. 86–117 и 156–236), «большой палец» (а. о. 237–318) и соединение (а. о. 319–426). р51 складывается в аналогичные четыре субдомена, что и домен полимеразы р66, однако положения субдоменов относительно друг друга различны в р66 и р51 (Kohlstaedt et al., 1992; Jacobo-Molina et al., 1993).

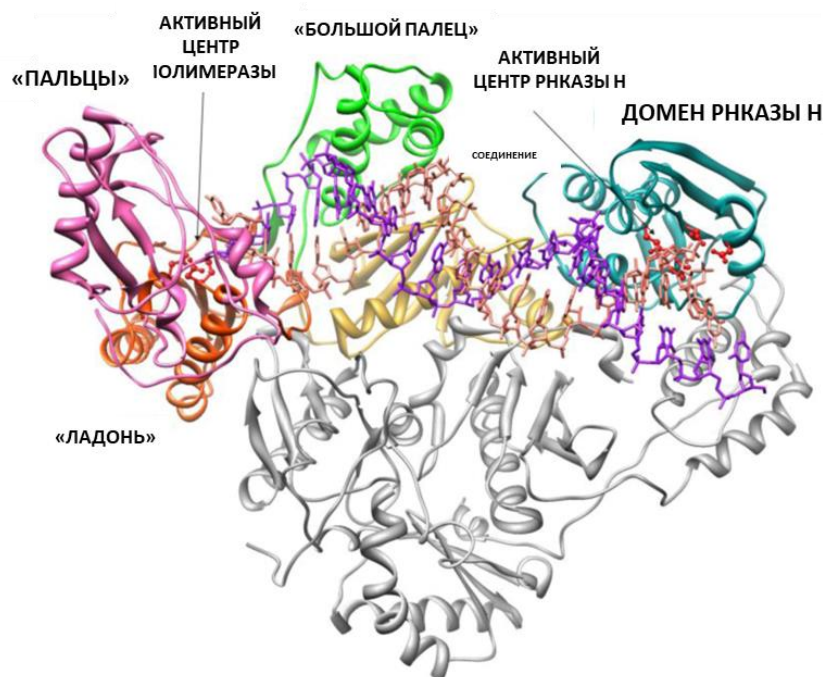


Рисунок 3 – Структура обратной транскриптазы p66/p51 ВИЧ-1 в комплексе с нуклеиновой кислотой. Субдомены субъединицы p66 изображены разными цветами; субъединица p51 изображена серым цветом (Pina et al., 2012).

Как было отмечено в таблице 1 в клинической практике применяют два класса препаратов, которые являются ингибиторами обратной транскриптазы – НИОТ и ННИОТ. НИОТ являются структурно разнообразными аналогами природных субстратов синтеза ДНК. Все одобренные НИОТ лишены 3'-ОН и действуют как терминаторы синтеза цепи при включении нуклеотидов в вирусную ДНК посредством обратной транскрипции (Rai et al., 2018).

Лекарственные препараты группы ННИОТ являются неконкурентными ингибиторами обратной транскриптазы, напрямую связываясь с аллостерическим сайтом фермента вблизи участка связывания нуклеозидов. В результате образования комплекса с препаратами этот участок перекрывается, и фермент связывается с меньшим числом нуклеозидов, что существенно замедляет репликацию вируса (Cihlar, Ray, 2010; Usach et al., 2013; Zhan et al., 2013; Rai et al., 2018; Namasivayam et al., 2019). Лекарственные препараты данного класса ингибиторов играют ключевую роль в качестве предпочтительных агентов для схем первого ряда АРТ и для профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери к ребенку.

Третья группа лекарственных препаратов – ингибиторы протеазы (ИП). Важным этапом в жизненном цикле ВИЧ является протеолитическое расщепление предшественников полипептидов на зрелые ферменты и структурные белки, катализируемое протеазой ВИЧ. Было показано, что отпочковавшиеся незрелые вирусные частицы, содержащие каталитически неактивную протеазу, не могут подвергнуться созреванию до инфекционной формы (Sundquist, Kräusslich, 2012). Необходимость протеазы в жизненном цикле вируса делает данный фермент важной мишенью для лечения ВИЧ-инфекции. Структура протеазы ВИЧ-1 была исследована с помощью рентгеноструктурного анализа. Зрелая протеаза существует в виде гомодимера с молекулярной массой 22 кДа, в котором каждая субъединица состоит из 99 аминокислотных остатков, образуя девять бета-листов и одну альфа-спираль (рисунок 4) (Yang et al., 2012).

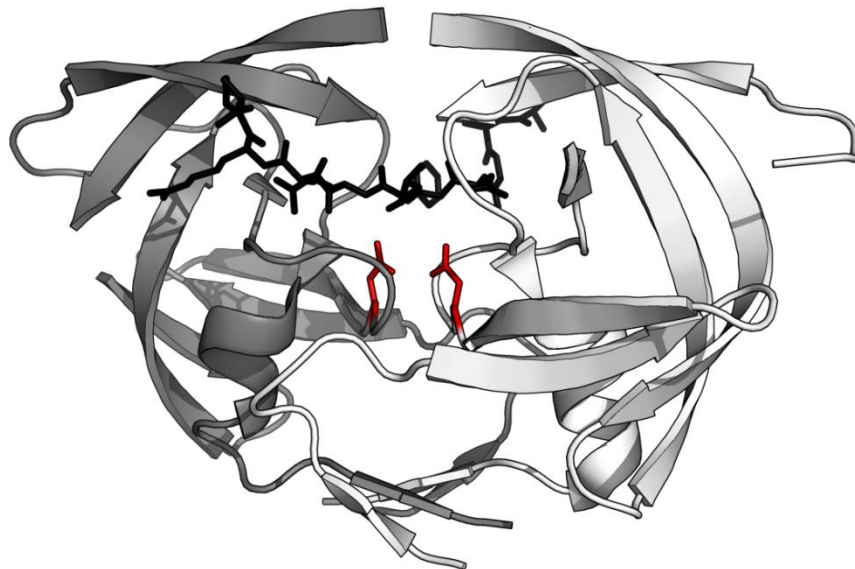


Рисунок 4 – Структура протеазы ВИЧ-1. Черным цветом обозначен пептидный субстрат; красным цветом выделены боковые цепи аспартата активного центра (Prabu-Jeyabalan et al., 2002).

Активный центр протеазы расположен между субъединицами и имеет характерную для аспартатных протеаз аминокислотную последовательность Asp-Thr-Gly (Asp25, Thr26 и Gly27) (Brik, Wong, 2003). Ядро активного центра

содержит по одному остатку аспартата от каждой субъединицы (Kipp et al., 2012) и является гидрофобным. Бета-листы субъединиц формируют две «створки», которые покрывают активную зону, закрывая доступ к ней (Yang et al., 2012). Эти створки могут находиться в разных конформациях (закрытая, полуоткрытая, открытая) (Hornak et al., 2006; Ding et al., 2008) и играют важную роль при взаимодействии активного центра с лигандом или субстратом (Yang et al., 2012; Huang, Chen, 2013).

Ингибиторы протеазы ВИЧ действуют как конкурентные ингибиторы, которые напрямую связываются с протеазой ВИЧ и предотвращают последующее расщепление полипептидов (Eron, 2000; Weber, Agniswamy, 2009; Lv et al., 2015; Ghosh et al., 2016). Первым разработанным ингибитором протеазы ВИЧ, является саквинавир, представляющий собой пептидомиметик гидроксиэтиламин, который является аналогом переходного состояния нативного субстрата протеазы. Основным критерием дизайна саквинавира было наблюдение за тем, что протеаза ВИЧ-1 расщепляет последовательности, содержащие дипептиды Tyr-Pro или Phe-Pro. Добавление группы декагидроизохинолина (DIQ) было одной из наиболее значительных модификаций, которые привели к разработке саквинавира. Этот заместитель повышает растворимость в воде и эффективность за счет ограничения конформационной свободы ингибитора (Eron, 2000; Lv et al., 2015).

Четвертая группа – ингибиторы интегразы (ИИ). После обратной транскрипции вирусной РНК образующаяся двухцепочечная молекула ДНК интегрируется в хромосому хозяина. Данную реакцию катализирует вирусный фермент – интеграза, которая состоит из 288 а. о. (Quashie et al., 2015). Молекулярная масса фермента составляет 32 кДа. В структуре интегразы выделяют три функциональных домена (рисунок 5): короткий N-концевой домен, формируемый а. о. с 1 по 50. Этот домен участвует в мультимеризации интегразы и стабилизации её укладки, и содержит мотив цинкового пальца His-His-Cys-Cys, который координирует ион цинка. Каталитический домен охватывает аминокислотные остатки с 50 по 212 и содержит каталитическую

триаду Asp64, Asp116 и Glu152, которая координирует ион двухвалентного металла – либо магний, либо марганец, необходимые для каталитической активности, и является абсолютно консервативной среди интеграз других ретровирусов и ретротранспозонов. Третий домен – С-концевой домен, включающий аминокислотные остатки с 220 по 270, обладает неспецифической ДНК-связывающей активностью (Chiu, Davies, 2004; Mouscadet et al., 2010).

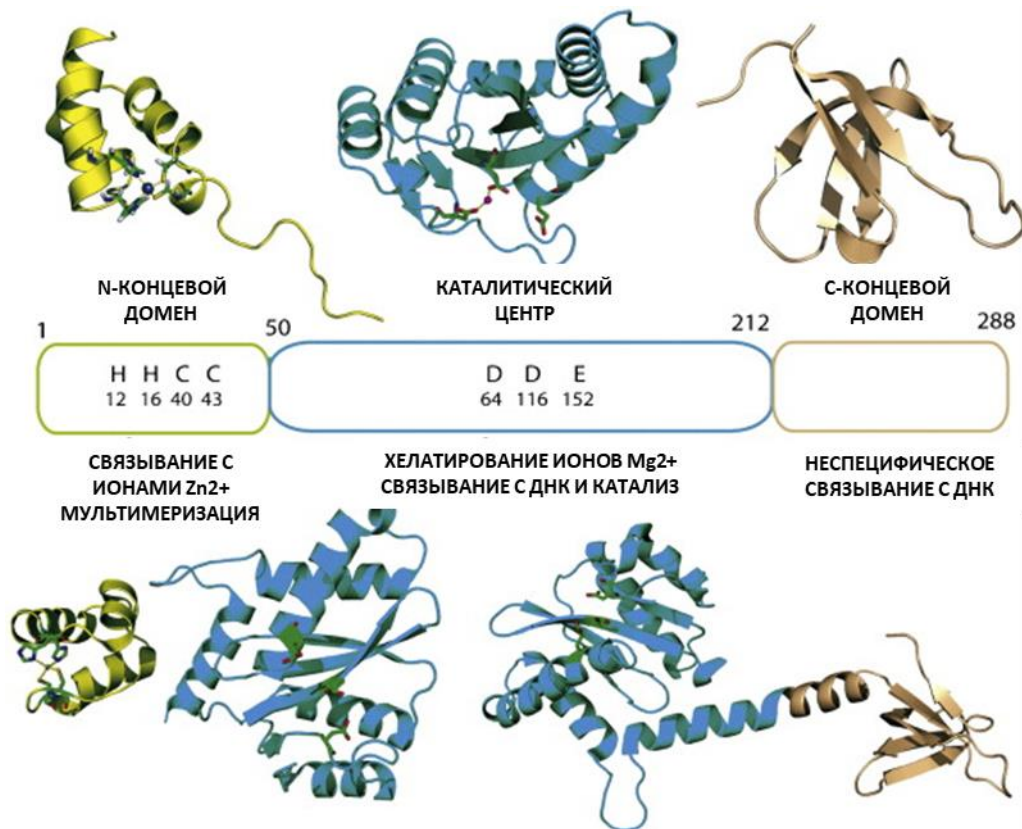


Рисунок 5 – Структурные домены интегразы ВИЧ-1 (вверху). N-конец с доменом каталитического ядра (внизу, слева) и каталитическое ядро с С-концевым фрагментом (внизу, справа). Катионы Zn²⁺ и Mg²⁺ представлены в виде шариков (Mouscadet et al., 2010).

Интеграция ДНК ВИЧ-1 протекает в несколько стадий: во-первых, в цитоплазме интегразы катализирует процессинг 3'-конца, при котором 2 концевых нуклеотида с каждого 3'-конца длинных концевых повторов вирусной ДНК удаляются, открывая динуклеотид СрА. Затем интегразы и вирусная ДНК в составе прединтеграционного комплекса транспортируются в ядро, где происходит реакция переноса цепи, включающая нуклеофильную

атаку 3'- гидроксильных групп процессированных цепей ДНК на межнуклеотидные фосфаты обеих цепей клеточной ДНК с образованием ковалентного продукта. Разрывы в ДНК восстанавливаются ферментами репарации двухцепочечных разрывов ДНК хозяина. В результате формируется полностью интегрированный провирус, фланкированный прямыми повторами (Агапкина и др., 2005; Craigie, 2012).

Как было отмечено в таблице 1 в клинической практике применяется два ингибитора интегразы – долутегравир и ралтегравир. Структурный и функциональный анализ долутегравира и ралтегравира, показал, что данные противовирусные агенты связываются с активным центром интегразы за счет хелатирования катионов двухвалентных металлов в каталитическом сайте фермента, блокируя этап переноса цепи при интеграции ДНК ВИЧ (рисунок 6) (Craigie, 2000; Temesgen, Siraj, 2008; Hajimahdi, Zarghi, 2016; Max, 2019).

Необходимо отметить, что для изучения и поиска ингибиторов обратной транскриптазы, протеазы и интегразы получены рекомбинантные аналоги данных ферментов, которые позволяют проводить скрининг потенциальных ингибиторов сначала в бесклеточной системе, а затем тестировать их с использованием первичных изолятов вируса и молекулярных клонов.

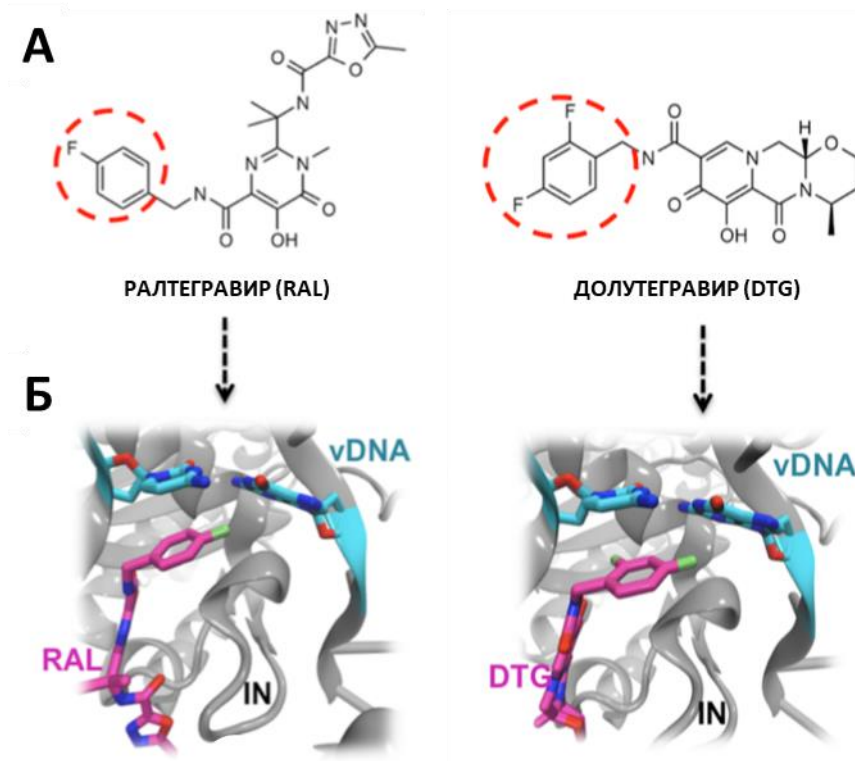


Рисунок 6 – Структуры ингибиторов интегразы: А – 2D структура ралтегравира и долутегравира. Красный пунктирный кружок указывает на галогенбензильный фрагмент. Б – Трехмерная рентгеновская структура с высоким разрешением каждого ингибитора в комплексе с интегразой (IN) и вирусной ДНК (vDNA) (El et al., 2019).

Пятая группа – ингибиторы проникновения ВИЧ-1 в клетку-мишень. Первым этапом жизненного цикла ВИЧ-1 является проникновение вируса в клетку-мишень, которое опосредуется взаимодействием тримерного комплекса Env (рисунок 7) с рецептором CD4 и ко-рецепторами CCR5 или CXCR4, поэтому Env является мишенью лекарственных препаратов и индуцируемых вакциной антител, направленных на блокирование данного этапа.

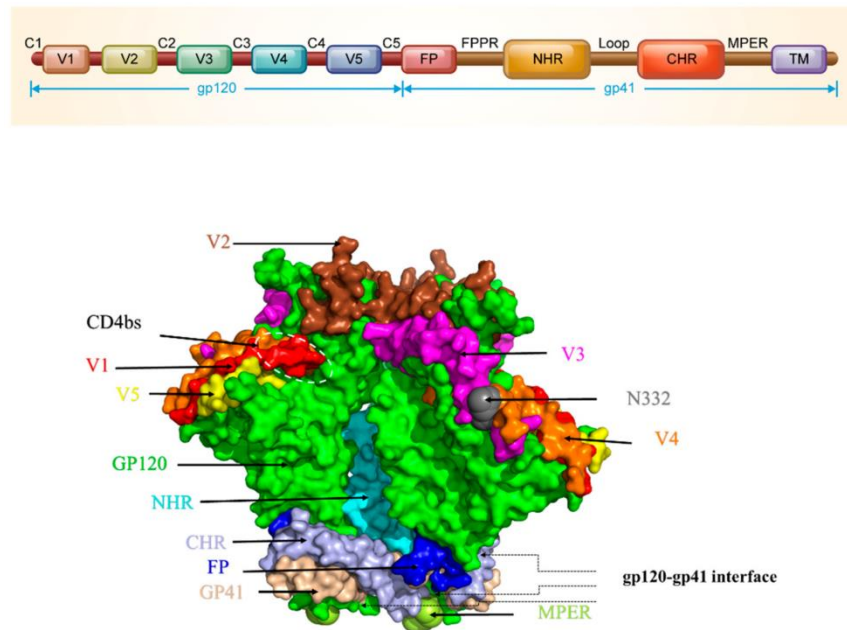


Рисунок 7 – Эктодоменная структура тримера Env ВИЧ-1 (вверху) и модель тримера gp120/gp41 ВИЧ-1 (внизу). gp120 окрашен зеленым цветом, области V1, V2, V3, V4 и V5 окрашены красным, коричневым, фиолетовым, оранжевым и желтым цветами соответственно. CD4bs выделен белой пунктирной рамкой; gp41 окрашен в светло-розовый цвет; его структурные домены – пептид слияния (FP), N-концевые гептадные повторы (NHR), C-концевые гептадные повторы (CHR) и мембрано-проксимальная наружная область (MPER) окрашены в синий, бирюзовый, голубой и светло-зелёный цвета соответственно (Pu et al., 2019).

Данная группа препаратов подразделяется на несколько классов – ингибиторы слияния, антагонисты корецепторов и ингибиторы CD4 рецептора. К ингибиторам слияния относится энфувиртид (T-20, ENF), который представляет собой сложный синтетический пептид (4492 г/моль), состоящий из 36 аминокислотных остатков – CH₃CO-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂. Энфувиртид нарушает проникновение ВИЧ на стадии слияния мембран. В отсутствие энфувиртида, слияние мембран вируса и клетки-хозяина включает сложный каскад процессов. Во-первых, gp120 связывается с рецептором CD4 на лимфоцитах хозяина, экспрессирующих CD4, что приводит к конформационным изменениям и связыванию gp120 с корецепторами CXCR4

или CCR5. Гликопротеин gp120 связывается с одним или обоими корецепторами, запуская процесс слияния путем внедрения гидрофобного N-конца gp41 в мембрану клетки-хозяина. Белок gp41 содержит две области гептадных повторов: первый и второй гептадные повторы, HR1 и HR2, которые связываются вместе в определенной конформации, в результате чего мембраны клетки хозяина и вируса стягиваются для слияния. Область HR1 образует тримерную спиральную структуру, тогда как область HR2 загибается обратно в гидрофобные канавки спирали HR1, образуя структуру шпильки. Шпилька содержит термодинамически стабильный пучок из шести спиралей, и именно этот пучок притягивает мембраны в непосредственную физическую близость для осуществления процесса слияния, что приводит к последующему инфицированию клетки. Энфувиртид предотвращает этот процесс, связываясь с доменом HR1 субъединицы gp41, тем самым ингибируя конформационные изменения, необходимые для слияния мембран. Последовательность аминокислот в энфувиртиде совпадает с последовательностью в домене HR2 gp41, что позволяет ему втиснуться в бороздку тримера HR1 вместо самого HR2 (Wild et al., 1994; Chan et al., 1998; Kliger, Shai, 2000; Kuritzkes, 2009; Qian et al., 2009; Lobritz et al., 2010).

К антагонистам корецептора относится – маравирик (MVC, UK-427,857). Маравирик является селективным антагонистом CCR5-корецептора с мощной противовирусной активностью против CCR5-тропных вирусов ВИЧ-1 в наномолярных концентрациях ($IC_{90} = 2,0$ нМ). В ходе исследования механизма действия было установлено, что маравирик обратимо связывается с ко-рецептором CCR5 с длительным временем диссоциации (Dong et al., 2005). Структура CCR5 включает семь трансмембранных спиралей, которые образуют центральный гидрофобный карман. От спиралей отходят хемокин-связывающие домены, охватывающие N-конец и три внеклеточные петли (ECL1, 2 и 3). Конец V3 петли gp120 взаимодействует в основном с областью ECL2, тогда как мостиковый лист gp120, который образуется между консервативными доменами gp120 ВИЧ-1 (C1, C2 и C4) после связывания с

CD4, и стержень петли V3 взаимодействует с N-концом CCR5 (Dragic et al., 1998; Farzan et al., 1999; Huang et al., 2005). Маравирок, как и другие антагонисты CCR5, действует как аллостерический модулятор, который блокирует сайт связывания рецептора не напрямую, а индуцирует и стабилизирует его конформационные изменения. Низкомолекулярные антагонисты CCR5 связываются внутри трансмембранных спиралей на внеклеточной поверхности корцептора. Их связывание приводит к специфическим перестройкам, которые не распознаются комплексом gp120-CD4 ВИЧ-1 (Lagane et al., 2013). В опубликованной кристаллической структуре маравирока с разрешением 2,7 Å в комплексе с человеческим рецептором CCR5, маравирок глубоко внедрен в полость внутри 7-й трансмембранной спирали, которая отличается от сайта связывания хемокинов и сайта узнавания gp120 ВИЧ-1 (Qian et al., 2009; Lobritz et al., 2010; Tan et al., 2013; Santoro, Perno, 2013; Veljkovic et al., 2015).

К ингибиторам CD4-рецептора относится ибализумаб (ibalizumab, Trogarzo), представляющий собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с CD4, первичным рецептором ВИЧ, и тем самым препятствует проникновению ВИЧ в клетки хозяина (Jacobson et al., 2009; Fessel et al., 2011). В 2018 году ибализумаб был одобрен в США для использования в составе комбинированной схемы антиретровирусной терапии у пациентов с множественной лекарственной устойчивостью. Рекомендуемая доза ибализумаба – это однократная внутривенная доза 2000 мг, за которой следует внутривенная поддерживающая доза 800 мг один раз каждые 14 дней в течение всего периода лечения (Markham, 2018; Rizza et al., 2019; Blair, 2020). Ингибирующая активность всех одобренных препаратов ингибиторов проникновения была показана с использованием технологии *env*-псевдовирусов ВИЧ-1, а также лабораторно-адаптированных штаммов ВИЧ-1.

Как было отмечено в начале данного пункта, геном ВИЧ-1 и связанные с ним белки и ферменты окружены белковой оболочкой, называемой

капсидом, который состоит примерно из 2000 копий вирусного белка p24. Капсидный белок p24 состоит из двух доменов, называемых N-концевым доменом (NTD) и C-концевым доменом (CTD), оба этих домена соединены гибким линкером (рисунок 8А). NTD состоит из семи α -спиралей (Н1 – Н7), β -складки и петли циклофилина А, а CTD состоит из спирали 3_{10} , четырех α -спиралей (Н8 – Н11) и N-терминальной удлиненной цепи. p24 образует пентамер и гексамер посредством взаимодействий NTD-NTD и взаимодействий NTD-CTD соответственно; затем около 12 пентамеров и 250 гексамеров собираются в зрелый капсид посредством взаимодействия CTD-CTD (рисунок 8Б). Основная функция капсида заключается в защите вирусной РНК со связанными с ней ферментами и вспомогательными белками вируса. Кроме того, капсид активно участвует в обратной транскрипции, ядерном импорте прединтеграционного комплекса и интеграции двухцепочечной вирусной ДНК в геном хозяина, сборке и почковании вирионов (Rossi et al., 2021). Эти факты делают капсидный белок перспективной мишенью для разработки новых противовирусных агентов. Не так давно, стали появляться работы, связанные с разработкой ингибиторов, нацеленных на капсидный белок p24, а именно связывающиеся с NTD, CTD и областью связывания NTD-CTD. В настоящее время проходит I фаза клинических испытаний ингибитора GS-6207, который связывается с областью взаимодействия NTD-CTD и обладает высокой противовирусной активностью и длительным метаболическим циклом. Вероятно, GS-6207 станет первым одобренным лекарством, нацеленным на капсид ВИЧ-1 (Sun et al., 2021).

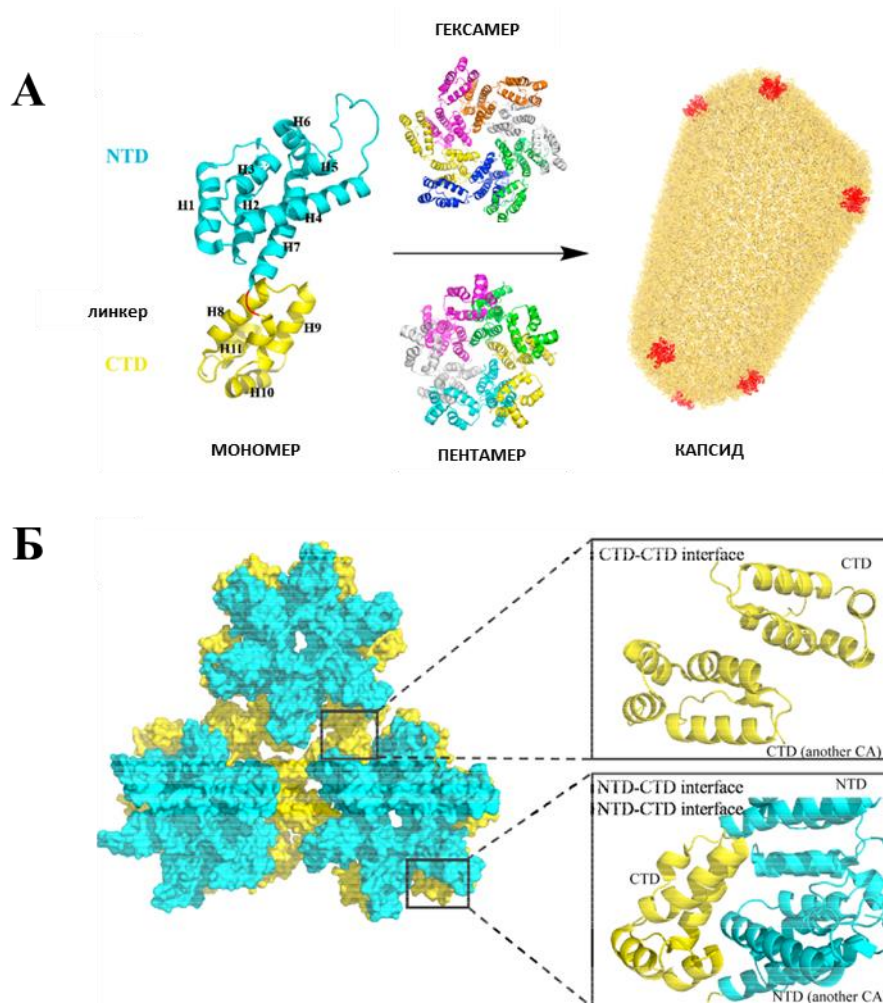


Рисунок 8 – А – Структуры мономера, пентамера, гексамера р24 и капсида ВИЧ-1; Б – Структурное изображение областей взаимодействия CTD-CTD, NTD-NTD и NTD-CTD (Sun et al., 2021).

Подводя итог, необходимо отметить, что более раннее начало лечения ВИЧ-инфекции безопасными, доступными по стоимости и простыми для использования лекарственными средствами может способствовать как поддержанию здоровья пациентов, так и уменьшению количества вируса в крови, что снижает риск передачи инфекции другим людям. В настоящее время антиретровирусная терапия является комбинированной, то есть включает комбинацию трех и более антиретровирусных препаратов с различными механизмами действия, что позволяет воздействовать на несколько мишеней ВИЧ одновременно и максимально подавить вирус.

1.3 Широконейтрализующие антитела и вакцины

Постоянное применение антиретровирусной терапии снижает вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных лиц, однако долгосрочное использование лучших лекарственных комбинаций АРТ по-прежнему неспособно вылечить пациента. Поэтому разработка профилактической вакцины, способной предотвратить заражение человека, является одной из главных задач в борьбе с ВИЧ-1.

На сегодняшний день, наиболее успешными были клинические испытания RV144, которые проводились в Таиланде. Компонентами данной вакцины является ALVAC-HIV (вектор на основе поксвируса канареек vCP1521, несущий гены *gag*, *pol* и *env*, производства Санофи Пастер) и AIDSVAX®gp120 B/E (рекомбинантные белки gp120 подтипов В и Е). Эффективность предотвращения инфицирования, т. е. снижение риска, обнаруженное в рамках испытаний RV144, составило 31,2 % после 3 лет наблюдения (Rerks-Ngarm et al., 2009). Иммунный корреляционный анализ показал, что вакцина RV144 не индуцировала образование антител, нейтрализующих первичные изоляты ВИЧ-1, но вызывала индукцию антител к V2 петле, которые связывались с поверхностью инфицированных CD4 Т-клеток и опосредовали антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) (Haynes et al., 2012; Tomaras et al., 2013; Pollara et al., 2013). Спустя несколько лет компоненты вакцины RV144 были адаптированы для экспрессии антигенов ВИЧ от штаммов, циркулирующих в Южной Африке, и был изменен адъювант для повышения иммуногенности (идентификатор клинических испытаний NCT03284710). Схема иммунизации включала – внутримышечную инъекцию вектора ALVAC-HIV (vCP2438) с временным интервалом введения 0, 1, 3, 6 и 12 месяцев в сочетании с двухвалентным компонентом – рекомбинантным gp120 подтипа С и адъювантом MF59 с временным интервалом введения 3, 6 и 12 месяцев. Анализ иммунного ответа вакцинированных добровольцев показал,

что у 100% реципиентов вакцины выработались IgG-связывающие антитела к антигенам gp120 со значительно более высокими титрами, чем соответствующие ответы RV144. CD4⁺ Т-клеточный ответ на белок Env ZM96.C составил 56,4% по сравнению с ответом 41,4% на 92TH023.AE в RV144. Гуморальный ответ IgG на вариабельные области V1 и V2 составил 70,5% что ниже, чем аналогичный ответ в RV144 (99,0%). В январе 2020 года были подведены итоги проведенных клинических испытаний, которые показали, что данная схема вакцинации не предотвращала инфицирование ВИЧ-1 среди добровольцев (Bekker et al., 2018; Gray et al., 2021). Данные результаты еще раз подчеркивают актуальность и необходимость разработки новых подходов по дизайну иммуногенов, способных обеспечить формирование протективного иммунитета.

В настоящее время на предмет безопасности, переносимости и иммуногенности проходят исследования мозаичной вакцины на людях, включающей векторы Ad26 и MVA (Modified vaccinia Ankara), экспрессирующие антигены Env/Gag/Pol ВИЧ-1, в комплексе с рекомбинантным gp140 подтипа С (идентификатор клинических испытаний NCT02315703). Согласно промежуточным результатам, все исследуемые схемы вакцинации продемонстрировали безопасность и переносимость. Однако, схема иммунизации, включающая праймирование вектором Ad26, и бустирование вектором Ad26 в комплексе с рекомбинантным gp140, показала наибольшую иммуногенность для людей и индуцировала Env-специфические ответы антител, антителозависимые ответы клеточного фагоцитоза и Т-клеточные ответы у 100%, 80% и 83% реципиентов вакцины соответственно. Данная схема вакцинации также индуцировала стойкий иммунный ответ у макаков-резусов и обеспечивала 66% защиту от заражения SHIV-SF162P3 (Barouch et al., 2018).

Большим научным событием стало открытие антител, способных нейтрализовать широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1. При детальном исследовании иммунного ответа ВИЧ-инфицированных индивидуумов было

установлено, что через 2-3 года после инфицирования, у многих индивидуумов формируются перекрестно-реактивные антитела и лишь у небольшой группы ВИЧ-инфицированных, обозначаемой термином «элитные контроллеры», формируются чрезвычайно мощный гуморальный иммунный ответ, опосредованный особым типом антител, получивших название – широконейтрализующие антитела или bnAbs (broadly neutralizing antibodies) (Cohen, Caskey, 2018). «Элитные контроллеры» стали объектом интенсивных исследований. Одной из основных причин изучения «элитных контроллеров» была возможность определить мишени для bnAbs на оболочке ВИЧ. Данные по картированию эпитопов на комплексе Env показывают, что bnAbs нацелены на семь регионов уязвимости (рисунок 9): это CD4-связывающий сайт – участок прикрепления gp120 к CD4; V1/V2-сайт, включающий N-связанные гликаны в позиции Asn160; гликан V3-сайт, который включает N-связанные гликаны в позиции Asn332; область взаимодействия gp120 и gp41; silent face регион; MPER-регион, находящийся на С-конце трансмембранного гликопротеина gp41; и пептид слияния, находящийся на N-конце субъединицы gp41 (Burton, Hangartner, 2016; Liu et al., 2020; Wang, Zhang, 2020). Условно, по времени выделения и характеристики bnAbs, их подразделяют на bnAbs первого поколения и второго поколения. bnAbs первого поколения были выделены в 1990-х годах и продемонстрировали ограниченную эффективность и широту нейтрализации. Однако с 2009 года были выделены новые мощные широконейтрализующие антитела второго поколения, которые дали дополнительный стимул работам в области создания вакцин и терапевтических препаратов на основе моноклональных антител (Burton, Hangartner, 2016; Liu et al., 2020; Wang, Zhang, 2020). Настоящий прорыв в получении и изучении широконейтрализующих антител стал возможным благодаря внедрению панелей псевдовирuсов, включающих большое разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1 (Mascola et al., 2005; Montefiori et al., 2017).

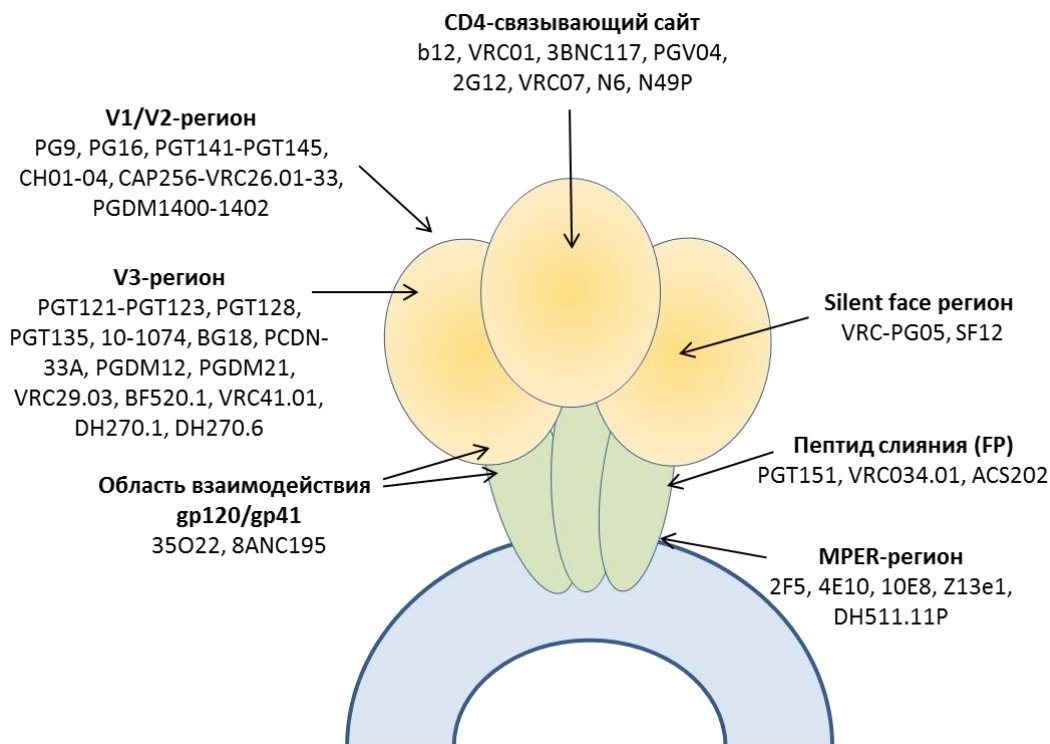


Рисунок 9 – Сайты связывания широконейтрализующих антител на схеме Env-тримера.

Многочисленные исследования на животных моделях показали, что bnAbs могут защитить от ВИЧ-инфекции (van Gils, Sanders, 2014; Pegu et al., 2017). В настоящее время несколько комбинаций bnAbs проходят клинические испытания на людях на предмет профилактики и лечения ВИЧ-инфекции (Caskey, 2020; Liu et al., 2020). На сегодняшний день получены обнадеживающие результаты для антител, нацеленных на CD4-связывающий сайт – VRC01 (идентификаторы клинических испытаний NCT03208231 и NCT02256631) (Mayer et al., 2017; Crowell et al., 2019; Cunningham et al., 2019) и 3BNC117 (Scheid et al., 2016), а также для антител, нацеленных на богатую гликанами V3-петлю – 10–1074 (Caskey et al., 2017). Это дает основания надеяться на то, что в будущем, для лечения и профилактики ВИЧ-инфекции препараты на основе bnAbs войдут в медицинскую практику. По сравнению с АРТ, лечение с использованием моноклональных антител может иметь такие преимущества, как низкая токсичность и длительный период полураспада антител (до 70 дней) по сравнению химиотерапевтическими агентами (до 2

дней), при этом основным препятствием использования антител для лечения и профилактики ВИЧ-инфекции на данный момент является высокая стоимость препаратов на основе моноклональных антител (Pegu et al., 2017; Gruell, Klein, 2018; Mahomed et al., 2020).

Выделение и характеристика bnAbs от ВИЧ-инфицированных людей, а также демонстрация того, что пассивное введение bnAbs может защитить от ВИЧ-инфекции, послужили стимулом для разработки иммуногенов, способных индуцировать bnAbs посредством вакцинации. В настоящее время активно исследуются различные подходы, включая активацию зародышевых В-клеточных линий с целью индукции bnAbs (Haynes et al., 2012; Jardine et al., 2013), использование растворимых тримеров, которые имитируют нативный Env (Sanders et al., 2013; Sanders, Moore, 2017), а также конструирование иммуногенов, нацеленных на консервативные эпитопы вируса или эпитопы bnAbs, и предназначенных для фокусирования иммунного ответа только на протективных детерминантах, исключив из состава вакцины нежелательные эпитопы, которые способны индуцировать аутореактивные антитела или антитела, усиливающие инфекционность вируса (Sahay et al., 2017; Bricault et al., 2019; Xu et al., 2018; Rudometov et al., 2019; Ou et al., 2020).

1.4 Методы оценки эффективности вакцин и химиотерапевтических препаратов *in vitro*. Изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1

Неотъемлемой частью научных исследований, связанных с разработкой вакцины и химиотерапевтических препаратов против вирусных патогенов, включая ВИЧ-1, является выбор инструмента, позволяющего оценить их эффективность *in vitro*.

Классическим методом вирусологии, позволяющим оценить нейтрализующую активность сывороток животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами, и эффективность химиотерапевтических агентов, является метод нейтрализации с использованием вирусных изолятов

ВИЧ-1 (Jackson et al., 1988). Изоляты вируса получают путем совместного со-культивирования МКПК (мононуклеарные клетки периферической крови) ВИЧ-положительного пациента с ФГА-стимулированными (фитогемагглютинин) МКПК здорового донора, при этом выделенные из крови вирусы представляют собой генетически неоднородную популяцию, вследствие квазивидовой природы ВИЧ-1. Для того чтобы исключить возможное селективное давление на вирусные изоляты и обеспечить наиболее оптимальное сохранение фенотипа вируса, его наработку ведут с использованием первичных культур клеток, а не перевиваемых клеточных линий (WHO-UNAIDS Guidelines, 2002; Voronin et al., 2007). Как правило, для определения наличия нейтрализующих антител в сыворотках, полученных от вакцинированных, или для определения эффективности исследуемого антивирусного агента, анализ нейтрализации также проводят на клеточной культуре МКПК с добавлением инфекционной дозы вируса и серийных разведений иммунной сыворотки или тестируемого соединения. Оценку подавления репликации ВИЧ-1 выполняют с помощью ИФА путем измерения концентрации белка р24 (структурный компонент капсида ВИЧ-1) в культуральной среде (Voronin et al., 2007; Гилязова и др., 2011; Зырянова и др., 2020). Однако использование первичных изолятов ВИЧ-1 для анализа вируснейтрализации имеет ряд недостатков, среди которых можно выделить – использование первичных клеток МКПК для репликации возбудителя, повышенные требования к биобезопасности, низкую воспроизводимость результатов и как следствие, сложность стандартизации (Mascola et al., 2005; Mann et al., 2009; Montefiori, 2009). Поэтому в первые годы разработки вакцин, для простоты и воспроизводимости экспериментов некоторые штаммы ВИЧ-1 (например, ПИБ/LAV, MN, SF2) были адаптированы для репликации в иммортализованных клеточных линиях (например, H9, CEM). Позже они были названы лабораторно-адаптированными штаммами, или точнее, вирусами, адаптированными к Т-клеточным линиям. При этом вакцинация добровольцев рекомбинантными тримерами, полученными на основе лабораторно-

адаптированных штаммов ВИЧ-1, приводила к индукции антител, нейтрализующих именно эти лабораторные штаммы. Однако дополнительные эксперименты с использованием первичных изолятов ВИЧ-1 показали, что, несмотря на мощную индукцию антител, нейтрализующих лабораторно-адаптированные штаммы, нейтрализация в отношении гетерологичных первичных изолятов, отсутствовала (Mascola et al., 1996; Mascola, Montefiori, 2010; Montefiori et al., 2017). Вследствие этого, использование лабораторно-адаптированных штаммов вируса для анализа нейтрализации могло привести к вводящим в заблуждение результатам, что снова привело исследователей к первичным изолятам как более адекватному инструменту для анализа вируснейтрализующей активности антител, образующихся в результате вакцинации. Поскольку данный метод является трудоемким и не позволяет проводить массовый анализ, его стали применять на заключительных этапах исследований.

1.5 Инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1

Поскольку первичные изоляты и лабораторно-адаптированные штаммы ВИЧ-1 характеризуются трудоемкостью культивирования и значительной разнородностью вследствие своей природы, а также вариабельности донорских МКПК, для стабильного воспроизведения вирусных частиц стали использовать инфекционные молекулярные клоны ВИЧ-1 (ИМК) (Edmonds et al., 2010). ИМК представляют собой вирусные частицы, полученные в результате трансфекции клеток плазмидным вектором, который содержит полную нуклеотидную последовательность ВИЧ-1, кодирующую структурные и функциональные белки вируса, а также регуляторные области, необходимые для образования патогенных вирусных частиц в культуре эукариотических клеток. В отличие от первичных изолятов ВИЧ-1, этот подход позволяет получать генетически однородные вирусные частицы, поскольку геном ВИЧ-1 находится в виде ДНК в составе плазмидного вектора (Edmonds et al., 2010;

Zyryanova et al., 2020). Для возможности стандартизации анализа нейтрализации с использованием ИМК, с помощью методов генетической инженерии были получены модифицированные перевиваемые клеточные линии, несущие на своей поверхности рецептор CD4 и ко-рецепторы CCR5 и CXCR4 (Princen et al., 2004; González et al., 2010). Поскольку ИМК представляют собой инфекционные вирусные частицы, то экспериментальная работа с ними, также, как и с первичными изолятами и лабораторно-адаптированными штаммами, требует соблюдения соответствующих мер биобезопасности и значительных временных затрат. В то же время, использование ИМК позволяет характеризовать и исследовать биологические свойства генетически различных изолятов ВИЧ-1 (Zyryanova et al., 2020; Ochsenbauer et al., 2012; Baalwa et al., 2013; Wang et al., 2013; Chenine et al., 2018), изучать механизмы возникновения лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ-1 и влияние мутаций на биологические свойства вируса (Johnston et al., 2005; Pugach et al., 2007; Reuman et al., 2010; Varghese et al., 2013), а также определять эффективность потенциальных ингибиторов вирус-специфичных ферментов (Зырянова и др., 2020; Wagstaff et al., 2019; Mavian et al., 2020).

1.6 Технология псевдовирюсов

Использование классических вирусологических методов для работы с ВИЧ-1 сталкивается с рядом сложностей, отмеченных выше. Для быстрой и адекватной оценки гуморального иммунного ответа, возникающего в ответ на вакцинные конструкции, и скрининга потенциальных химиотерапевтических агентов, а именно ингибиторов проникновения, наилучшим образом подходит технология псевдовирюсов (Montefiori et al., 2017). В отличие от изолятов вируса и инфекционных молекулярных клонов работа с псевдовирюсами безопасна, поскольку геном псевдовирюсов изменен так, чтобы их развитие ограничивалось только одним циклом. Поэтому псевдовирюсы также называются «вирусами одного цикла инфекции» (Li et al., 2018; Кононова и

др., 2018). Для получения псевдовирусов чаще всего используют две платформы – лентивирусную и рабдовирусную.

Основу лентивирусной платформы составляют плазмидные векторы, разработанные на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), вируса иммунодефицита обезьян (ВИО) (Sandrin et al., 2002; Sandrin, Cosset, 2006), вируса иммунодефицита кошек (ВИК) (Medina et al., 2003) и вируса мышинного лейкоза (Sakuma et al., 2010). Данные векторы сохраняют генетические последовательности, необходимые для вирусной транскрипции, упаковки и интеграции, за исключением тех, которые кодируют белки оболочки.

Наиболее широко используемой лентивирусной системой для получения псевдовирусов является система упаковки на основе ВИЧ-1. Для создания этой системы упаковки гены ВИЧ избирательно клонируют в составе ДНК-векторов (рисунок 10А). В частности, в качестве векторов используются от 2 до 4 плазмид, с целью минимизации рекомбинации вирусных генов и, как следствие, снижения вероятности возврата к вирусу дикого типа. В зависимости от этого, выделяют несколько поколений лентивирусных систем. Первое поколение лентивирусных систем упаковки включает 2 плазмиды, из которых одна плазида несет в своем составе ген поверхностного гликопротеина оболочки и является *оболочечной*, а другая плазида является *коровой* или *упаковочной*, и несет гены белков лентивируса, необходимые для вирусной транскрипции, упаковки и интеграции (рисунок 10Б). Позднее, появились системы упаковки, состоящие из 3 или 4 плазмид – второе и третье поколение, соответственно. Так, второе поколение включает *упаковочную* плазмиду, экспрессирующую белки Gag и Pol; *трансферную* плазмиду, содержащую репортерный ген, цис-регуляторные элементы, необходимые для обратной транскрипции, интеграции и упаковки, а также множественные сайты клонирования; и *оболочечную* плазмиду, экспрессирующую поверхностный гликопротеин (рисунок 10В) (Ao et al., 2008; Guo et al., 2009; Ferrara et al., 2012). Третье поколение, кроме вышеописанных плазмид,

включает дополнительную плазмиду, экспрессирующую белок Rev (рисунок 10Г) (Dull et al., 1998).

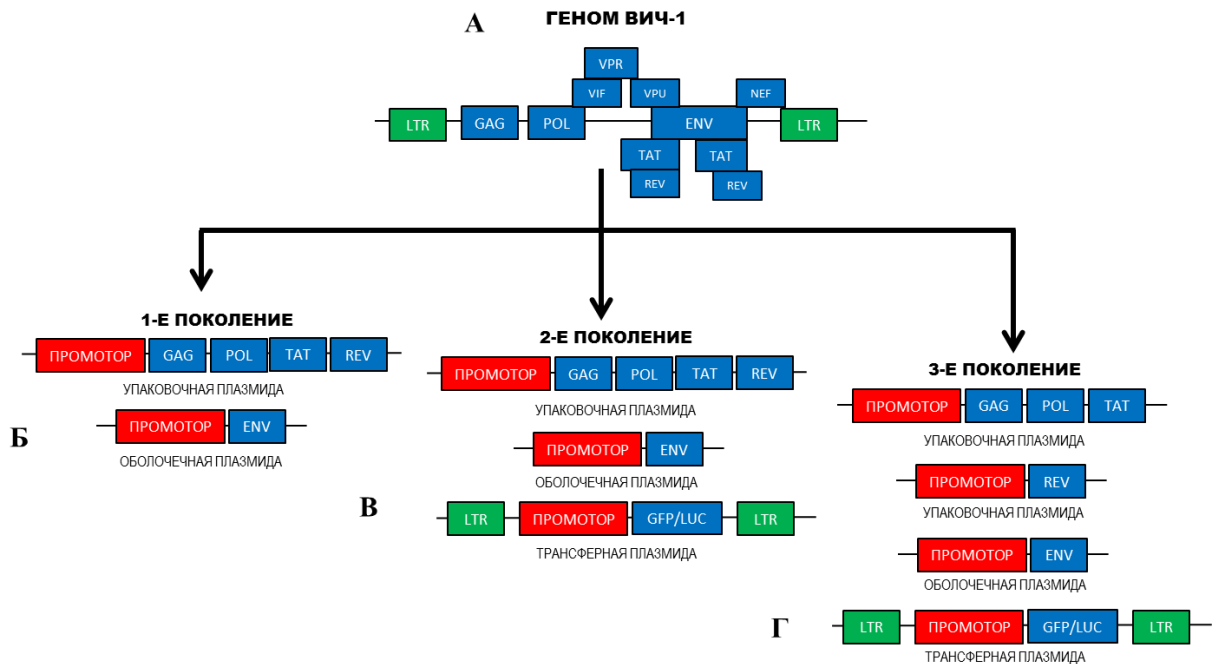


Рисунок 10 – Схематическое изображение лентивирусной системы для получения псевдовирусов. Для получения лентивирусной системы упаковки на основе ВИЧ-1 геном вируса (А) разделяют на несколько частей, и клонируют в ДНК-векторы. Первое поколение лентивирусной системы упаковки на основе ВИЧ (Б) включает 2 плазмиды – *упаковочную*, которая несет гены белков, необходимые для вирусной транскрипции, упаковки и интеграции, и *оболочечную*, которая несет в своем составе ген поверхностного гликопротеина оболочки. Второе поколение (В) включает *упаковочную* и *оболочечную* плазмиды, а также *трансферную* плазмиду, которая содержит репортерный ген (зеленый флуоресцентный белок, люцифераза), цис-регуляторные элементы, необходимые для обратной транскрипции, интеграции и упаковки, а также множественные сайты клонирования. Третье поколение (Г) помимо *упаковочной*, *оболочечной* и *трансферной* плазмид, включает дополнительную плазмиду, экспрессирующую белок Rev.

Помимо лентивирусных систем упаковки, существует система упаковки, основанная на использовании вируса везикулярного стоматита (VSV, vesicular stomatitis virus). В первоначальных исследованиях для ко-инфекции клеток использовали два вируса, VSV и любой другой вирус, в результате чего формировался псевдотипированный вирус, несущий кор VSV с белками оболочки, полученными от другого вируса (Huang et al., 1974).

Исследовательской группой под руководством Стиллмана впервые была клонирована кДНК генома VSV в составе плазмиды, для того чтобы сделать его стабильным (Stillman et al., 1995). Данную плазмиду впоследствии использовали для получения псевдовирусов, несущих различные гликопротеины (Schnell et al., 1996; Whitt, 2010). Позднее в этот плазмидный вектор были добавлены различные репортерные гены с целью облегчения обнаружения сборки вирусных частиц (Kaku et al., 2009; Moeschler et al., 2016). С использованием системы на основе VSV были получены псевдовирусы Эбола (Takada et al., 1997; Quinn et al., 2009), вируса гепатита С (Matsuura et al., 2001), хантавируса (Ogino et al., 2003; Lee et al., 2006) и др. Примечательно, что при использовании системы упаковки VSV для продукции псевдовирусных частиц, может иметь место остаточный вирус VSV, смешанный с псевдовирусом, что усложняет анализ нейтрализации, в котором он используется, или дает ложноположительные результаты. Вследствие этого, количество VSV должно быть минимизировано путем обработки препарата псевдовируса VSV-нейтрализующим антителом до его использования в последующих анализах (Li et al., 2018).

Поскольку данная диссертационная работа направлена на получение *env*-псевдовирусов ВИЧ-1, поподробнее остановимся на их характеристике. *Env*-псевдовирусы ВИЧ-1 представляют собой рекомбинантные вирусные частицы, полученные путем трансфекции эукариотических клеток двумя плазмидами – *коровой* и *оболочечной*. *Коровая* плазида содержит гены структурных (Gag и Pol), регуляторных (Tat и Rev) и вспомогательных (Vpr, Vpr, Vif и Nef) белков ВИЧ-1, которые необходимы для сборки вирусных частиц, а также последовательности, необходимые для упаковки вирусной РНК (Ψ); *оболочечная* плазида несет ген поверхностного гликопротеина (Env) определенного подтипа ВИЧ-1. В результате котрансфекции клеток *коровой* и *оболочечной* плазмидами происходит формирование вирусных частиц с дефектным геномом (с делецией гена *env*), не способным обеспечить сборку инфекционных дочерних вирионов при заражении (Li et al., 2005; Li et

al., 2018). С помощью электронной микроскопии показано, что при трансфекции клеточной линии HEK293 двумя плазмидами, происходит формирование вирусных частиц, морфологически идентичных вирионам ВИЧ-1 (Zaitsev et al., 2019; Ladinsky et al., 2020). Определение функциональной активности *env*-псевдовирусов и анализ нейтрализации проводят на клеточной линии TZM-bl, которая является перевиваемой, генетически модифицированной клеточной линией HeLa, на поверхности которой локализованы рецепторы CD4 и ко-рецепторы CCR5 и CXCR4. Кроме того, в геном клеточной линии TZM-bl интегрированы репортерные гены люциферазы светлячка и β -галактозидазы *E. coli* под транскрипционным контролем длинного концевой повтора ВИЧ-1. При проникновении псевдовируса в клетку-мишень TZM-bl в ответ на синтез вирусного белка Tat запускается экспрессия репортерного гена люциферазы, которая детектируется с помощью люминометра, при этом высокая интенсивность люминесценции соответствует проникновению псевдовирусных частиц в клетки-мишени, а подавление люминесценции, наоборот, указывает на нейтрализацию *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 (Platt et al., 1998; Wei et al., 2002). На рисунке 11 представлен общий принцип работы *env*-псевдовирусной системы.

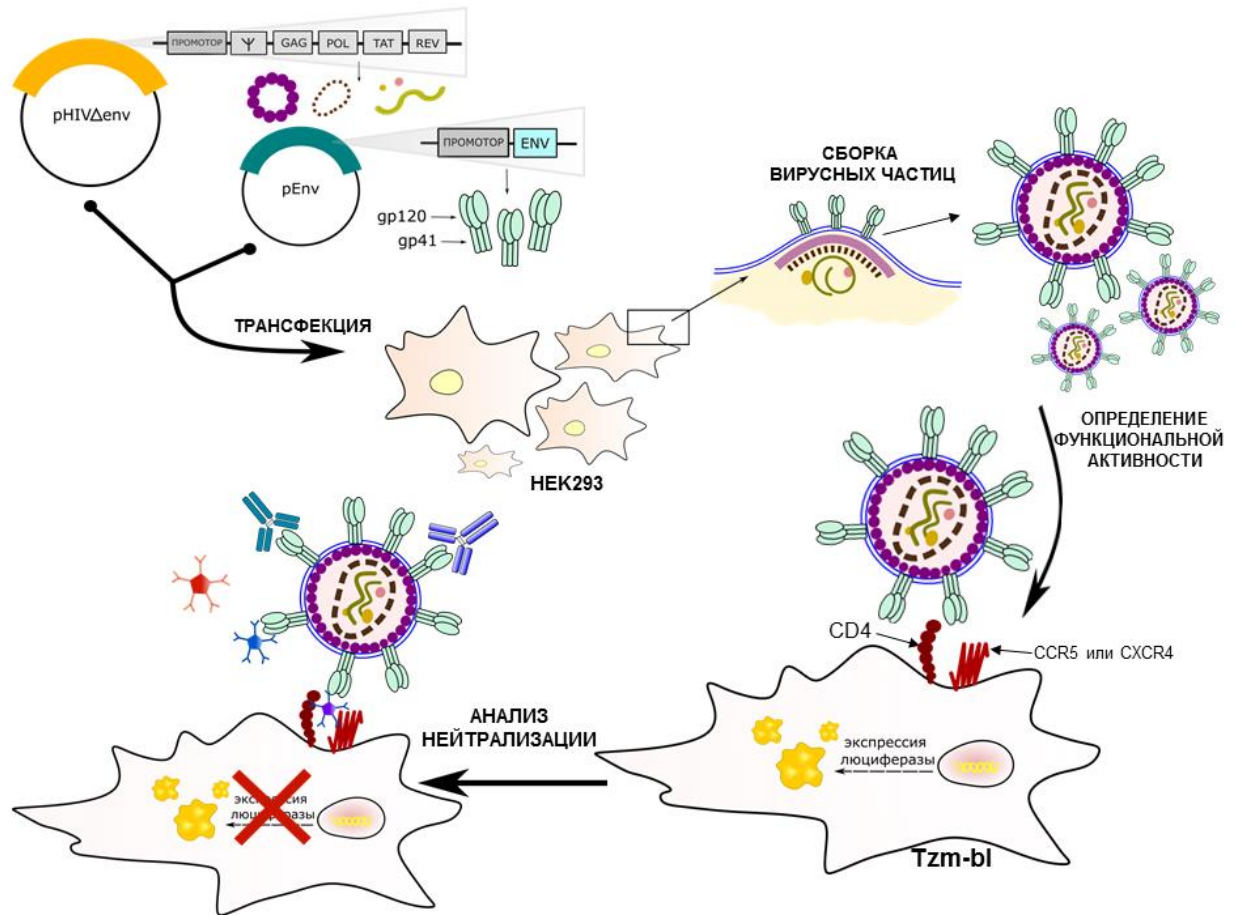


Рисунок 11 – Схема работы с *env*-псевдовиральной системой ВИЧ-1. Условно экспериментальную работу с *env*-псевдовиралами можно разделить на несколько этапов: 1 этап включает сборку вирусных частиц с помощью котрансфекции клеточной линии HEK293 с использованием двух плазмид – *коревой* и *оболочечной*; 2 этап включает определение функциональной активности псевдовиральных частиц, то есть способности заражать клетки-мишени и активировать репортерный ген люциферазы светлячка; и 3 этап – это непосредственно анализ нейтрализации с использованием иммунных сывороток или химиотерапевтических агентов с целью определения их способности блокировать проникновение псевдовируса в клетку-мишень.

Поскольку разрабатываемые вакцины и лекарственные препараты против ВИЧ-1 должны учитывать глобальное генетическое разнообразие вируса, стали создаваться панели *env*-псевдовирусов, включающие различные генетические подтипы ВИЧ-1 (deCamp et al., 2014). На данный момент в литературе описаны панели псевдовирусов для подтипов A, A/D, D (Blish et al., 2009), C (Blish et al., 2009; Hraber et al., 2017), B (Li et al., 2005), G и F (Revilla et al., 2011), CRF01_AE (Nie et al., 2010; Nie et al., 2020), CRF02_AG

(Stefic et al., 2019), CRF07_BC и CRF08_BC (Nie et al., 2020). Помимо этого, национальными институтами по контролю над продуктами и лекарствами Китая была разработана панель псевдовирусов ВИЧ-1, которая включает 462 вирусных штамма и охватывает большинство современных подтипов и циркулирующих рекомбинантных форм, распространенных в Китае. Данная панель псевдовирусов рекомендована для использования учеными, занимающимися исследованиями и разработкой вакцин и противовирусных препаратов против штаммов ВИЧ-1, распространенных в Китае (Nie et al., 2020).

В качестве примера использования панелей псевдовирусов, следует отметить, что противовирусная активность клинически одобренного антагониста ко-рецептора маравирока была продемонстрирована с помощью 160 *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 подтипа В и 40 *env*-псевдовирусов других подтипов ВИЧ-1 (Dorr et al., 2005). Активность ибализумаба, моноклонального антитела, которое связывается с CD4-рецептором, была показана на 116 *env*-псевдовирусах, относящихся к подтипам А, В, С, CRF01_AE (Pace et al., 2013). С помощью панелей псевдовирусов ВИЧ-1 был исследован и спектр действия bNAbs в отношении различных генетических вариантов ВИЧ-1. Так, например, было показано, что широта нейтрализации для bNAbs 10E8 составила 98% и была продемонстрирована на панели, включающей более 180 *env*-псевдовирусов подтипов А, В, С, D, G, CRF01_AE и CRF02_AG (Huang et al., 2012); широта нейтрализации bNAbs VRC01 составила 91% и была продемонстрирована на 196 *env*-псевдовирусах (Wu et al., 2010); широта нейтрализации bNAbs VRC34.01 составила 49% и была продемонстрирована на 179 *env*-псевдовирусах (Kong et al., 2016). Именно благодаря внедрению панелей псевдовирусов, включающих большое разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1, произошел прорыв в получении и характеристике моноклональных широконейтрализующих антител.

Панели *env*-псевдовирусов активно используются для изучения гуморального иммунного ответа, индуцируемого кандидатными вакцинами

против ВИЧ-1 в ходе их разработки, доклинических и клинических испытаний, поскольку одним из основных показателей эффективности вакцины является способность индуцировать антитела, которые могут не только узнавать, но и нейтрализовать вирус (Рыжиков и др., 2012; Rudometov et al., 2019; Ou et al., 2020).

Завершая данный раздел, хотелось бы отметить, что система псевдотипирования ВИЧ-1 толерантна к инкорпорации поверхностных белков различных оболочечных вирусов. Учитывая тот факт, что большинство лабораторных исследований и экспериментов с вирусами должны проводиться в условиях BSL-3 или BSL-4, использование технологии псевдовирюсов вместо вирусов дикого типа, предоставляет возможность изучать интересующий вирус различным исследовательским группам и проводить разработку противовирусных препаратов или вакцин против особо опасных патогенов. Например, с использованием системы псевдотипирования ВИЧ-1, были получены вирусные частицы, несущие поверхностные гликопротеины вируса Эбола (Mohan et al., 2015), вируса Марбург (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2019), вируса Ласса (Zhu et al., 2019; Zhang et al., 2019), коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (Zhao et al., 2013), вируса бешенства (Nie et al., 2017), вируса чикунгуньи (Wu et al., 2017) и вируса Нипах (Nie et al., 2019). Кроме того, на основе данной технологии активно разрабатываются псевдовирусные платформы для SARS-CoV-2 (Shang et al., 2020; Hu et al., 2020; Hyseni et al., 2020; Johnson et al., 2020).

1.7 Заключение

Главным событием конца 20 – начала 21 века в области ВИЧ/СПИДа стало внедрение и использование АРТ, позволяющей увеличить качество и продолжительность жизни ВИЧ-инфицированного индивидуума. Мишенями вируса, на которые направлены существующие лекарственные препараты, являются вирус-специфичные ферменты – обратная транскриптаза, протеаза и

интеграза. Тримерный комплекс Env является мишенью не только для химиотерапевтических агентов, но и для вакцинных конструкций, цель которых вызвать индукцию антител, связывающихся с Env, и тем самым нейтрализовать вирус.

В настоящее время лидирующие позиции среди подходов по оценке гуморального иммунного ответа против ВИЧ-1, возникающего в ответ на вакцинные конструкции, и скрининга потенциальных химиотерапевтических агентов, занимает технология *env*-псевдовирусов. Целью данной диссертационной работы является конструирование *env*-псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации, в частности Сибирского федерального округа, и их использование для скрининга соединений, блокирующих проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень. Данная технология является безопасной, позволяет поддерживать высокий уровень воспроизводимости результатов, а метод нейтрализации с использованием *env*-псевдовирусов можно оптимизировать и стандартизировать.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы

DEAE-декстран (Sigma, США); агар (Difco, США); агароза (Helicon, Россия); ампициллин (Биосинтез, Россия); триптон (Difco, США); бромфеноловый синий (Helicon, Россия); 5×буфер для лизиса клеточной культуры (Promega, США); гентамицин (Gibco, США); глицерин (Merck, США); L-глутамин (Вектор, Россия); диметилсульфоксид, DMSO (Helicon, Россия); дрожжевой экстракт (Difco, США); Lipofectamin 3000 (Invitrogen, США); набор для клонирования pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen, США); натрия хлорид (Helicon, Россия); питательная среда DMEM/F12 (Вектор, Россия); реагент для анализа люциферазы LAR (Promega, США); фетальная бычья сыворотка (Gibco, США), МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (AppliChem, Германия), раствор Версена (Вектор, Россия), трипсин (Вектор, Россия), фосфатно-солевой буфер (Биолот, Россия), трипановый синий (Helicon, Россия).

Наборы для выделения ДНК

Наборы производства «Евроген» (Россия): набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard, набор для выделения и очистки плазмидной ДНК из культуры *E. coli* Plasmid Miniprep.

Наборы производства «Qiagen» (Германия): QIAprep Spin Miniprep и Midiprep для выделения и очистки плазмидной ДНК.

Питательные среды и компоненты для работы с эукариотическими клетками

Питательная среда DMEM/F12 без L-глутамина; L-глутамин (Sigma, США; Вектор, Россия); фетальная бычья сыворотка (Gibco, США); раствор трипсина-версена (1:1) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия); Lipofectamin 3000 (Invitrogen, США); 5×буфер для лизиса клеточной культуры (Promega, США); реагент для анализа активности люциферазы, LAR (Promega, США).

Питательные среды для работы с бактериями

LB-бульон, на 1 л: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, pH 7,5 – 7,6;

LB-агар, на 1 л: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, агар – 15 г, pH 7,5 – 7,6;

SOC – среда, на 1 л: триптон – 20 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, 0,01 M NaCl, 0,01 M KCl, 0,02 M глюкозы, 0,02 M MgCl₂;

SOB – среда, на 1 л: триптон – 20 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, 0,01 M NaCl, 0,01 M KCl, 0,02 M MgCl₂;

Все питательные среды стерилизовали путем автоклавирования.

Буферы и растворы

ТАЕ: Трис-HCl – 40 mM; ацетат натрия – 20 mM; ЭДТА – 2 mM; pH 8,0;

CaCl₂: 50 mM CaCl₂, 10 mM трис-HCl, pH 8,0;

Раствор для нанесения ДНК – 0,25 %-й бромфеноловый синий, 0,25 %-й ксиленцианол, 50 %-й водный раствор глицерина;

Раствор бромистого этидия (10 мг/мл).

0,4%-ный раствор трипанового синего в буферном изотоническом солевом растворе, pH 7,2- 7,3;

При необходимости растворы стерилизовали путем фильтрации через мембранный фильтр 0,22 мкм (TPP, Швейцария).

Ферменты и маркеры молекулярных масс ДНК и белков

Маркер длин фрагментов ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); набор для обратной транскрипции SuperScript IV (Invitrogen, США); 2× реакционная смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color для ПЦР (Биолабмикс, Россия).

Бактерии, плазмиды

Штаммы *Escherichia coli*, использованные в работе (получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»):

NEB Stable (F' *proAB lacIq Δ(lacZ)*M15 *zzf::Tn10* (TetR)/*Δ(ara-leu)* 7697 *araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- ø80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL* (StrR) *rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*).

В работе использовали следующие плазмиды и их производные: плаزمида pcDNA3.1 (Invitrogen, США); плазмиды pSG3deltaEnv, pSF162.LS, p6535.3, pTRO.11, pTRJO4551.58, pQHO692.42 были получены по программе предоставления реагентов для исследования СПИД NIH AIDS Reagent Program, США.

Эукариотические клеточные линии

В работе использовали культуры клеток:

TZM-bl (JC53-bl) – линия HeLa/CD4/CCR5 (получена по программе NIH AIDS Reagent Program, США).

293T/17 – перевиваемая линия клеток почки эмбриона человека; была предоставлена отделом «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Моноклональные антитела

В работе использовали следующие моноклональные широконейтрализующие антитела к ВИЧ-1: 2F5, 2G12, 4E10, 10E8, PG9, PG16, PGT121, PGT126, VRC01. Антитела получены по программе NIH AIDS Reagent Program.

Образцы сывороток крови

В работе были использованы 12 сывороток крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, полученных из ГБУЗ Новосибирской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»; 19 сывороток, полученных из ГБУЗ «Кемеровский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»; 12 сывороток из Алтайского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями; 45 сывороток из БУЗ Республики Алтай «Центр по профилактике и борьбе со СПИД», 22 сыворотки из ГБУЗ Республики Хакасия «РЦПБ СПИД», в соответствии с положительными решениями этических комитетов указанных СПИД-центров.

2.2 Методы

2.2.1 Выделение РНК ВИЧ-1

Общий пул РНК выделяли с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «МАГНО-сорб» (AmpliSens, Россия) согласно рекомендации производителя. Выделенные образцы РНК хранились при -80°C .

2.2.2 Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием праймера UNINEF7' для получения кДНК гена *env* и VIF-VPUoutR1 для получения кДНК гена *pol* (таблица 2) с помощью набора SuperScript IV (Invitrogen, США). Реакцию обратной транскрипции проводили в общем объеме 20 мкл, содержащем 10 mM dNTPs, 10 мкМ праймера, 1xRT буфер, 100 mM DTT, 40 ед. RnaseOUT, 200 ед. SuperScript IV и RNase H. Вначале, 10 мкл РНК с праймером (UNINEF7' или VIF-VPUoutR1) и dNTPs инкубировали при 65°C в течение 5 минут, затем добавляли остальные реагенты для синтеза кДНК и инкубировали при 55°C в течение 10 минут, а затем инактивировали при 80°C в течение 10 минут. После этого добавляли 2 ед. РНКазы H *E. coli* и реакционные пробирки инкубировали при 37°C в течение 20 минут. Готовую кДНК непосредственно использовали для амплификации или хранили при -20°C .

Таблица 2 – Олигонуклеотидные праймеры, используемые для ОТ и ПЦР

Название праймера	Позиция HXB2	Последовательность (5'-3')	Ссылка
UNINEF7'	9605–9632	GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTT	Nadai Y. et al., 2008
VIF-VPUoutR1	6324–6352	GGTACCCCATAATAGACTGTRACCCACAA	Nadai Y. et al., 2008
RP-1-S	2016-2041	GAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAA	Shcherbakova, 2014
RP-1-A	3685-3716	AAATTTAGGAGTCTTTCCCCATATTACTATG C	Shcherbakova, 2014

Продолжение таблицы 2

PR-O-S2	2080-2107	GCTAATTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTT	Shcherbakova, 2014
RT-O-A	3630-3662	TGCCTCTGTTAATTGTTTTACATCATTAGT GTG	Shcherbakova, 2014
Env_S-1	5780-5804	TTGGGTGTCAACATAGCAGAATAGG	Щербакова, 2017
Env_02A_ AS_1	8996-9016	CCTGTGGCCTGACTGGAAAGC	Щербакова, 2017
Env_S-2	5957-5983	TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG	Щербакова, 2017
Env_A- FSU_AS- 2	8884-8914	GCTTATCCAAATCTTGAGATACTGGTCCTA	Щербакова, 2017
JA168	6962-6983	ACAATGTACACATGGAATTARGCCA	Щербакова, 2017
JA169B	7350-7374	AGAAAAATTCYCCTCYACAATTAAA	Щербакова, 2017
JA167	6847-6870	TATCYTTTGAKCCAATTCCCATAC	Щербакова, 2017
JA170	7365-7389	GTGATGTATTTCARTAGAAAAATTC	Щербакова, 2017

2.2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Амплификацию генов ВИЧ-1 проводили с использованием «гнездовой» ПЦР (nested-PCR), состоящей из двух раундов. Для амплификации области гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы, были использованы праймеры RP-1-S и RP-1-A для 1-го раунда ПЦР и PR-O-S2 и RT-O-A для гнездовой ПЦР (таблица 2). Для амплификации гена *env* были использованы праймеры Env_S-1 и Env_02A_AS_1 (1 раунд ПЦР) и Env_S-2 и Env_A-FSU_AS-2 для гнездовой ПЦР (таблица 2). Амплификацию проводили с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Россия) по протоколу производителя. Реакционную смесь размораживали, осторожно и тщательно перемешивали. Затем в тонкостенные пробирки для ПЦР добавляли следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) – 25 мкл, прямой праймер (10 мкМ) – 1,5 мкл, обратный праймер (10 мкМ) – 1,5 мкл, кДНК – 2 мкл и стерильная вода до 50 мкл. Смесь осторожно перемешивали на вортексе и

сбрасывали капли, используя центрифугу. Готовую реакционную смесь перемещали в предварительно прогретый до 95°C амплификатор (БИС-М-111-05-30, Россия). ПЦР проводили, используя следующий режим – предварительная денатурация – 95°C в течение 5 минут, затем 30 циклов: 95°C – 15 секунд, 55°C – 30 секунд, 72°C – 1 мин/т.п.о., финальная элонгация при 72°C в течение 5 минут. После проведения ПЦР продукты амплификации анализировали с помощью горизонтального электрофореза в 1%-м агарозном геле.

2.2.4 Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля

Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля проводили с использованием набора реагентов Cleanup Standard (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

2.2.5 Клонирование гена *env* ВИЧ-1

Клонирование гена *env* ВИЧ-1 проводили в составе коммерческого экспрессионного вектора pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen, США). Реакцию лигирования проводили по протоколу производителя. Для этого смешивали 2 мкл очищенной ДНК (ПЦР-продукт гена *env*), 1 мкл TOPO TA вектора, 1 мкл солевого раствора и 2 мкл стерильной воды и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем проводили трансформацию с использованием химически компетентных клеток NEB Stable (New England Biolabs, United Kingdom).

2.2.6 Трансформация компетентных клеток *E.coli* NEB Stable методом heat-shock

К 50 мкл компетентных клеток NEB Stable добавляли 4 мкл лигирующей смеси. Инкубировали на льду 30 минут. Далее проводили тепловой шок при 42°C в течение 30 секунд на водяной бане. После этого инкубировали на льду

2 минуты и добавляли 1 мл LB-среды. Инкубировали 1 час при 37°C в термостатируемой качалке. Затем культуру осаждали центрифугированием 6000 об/мин в течение 2 минут, отбирали супернатант, ресуспендировали биомассу в 100 мкл LB и высевали на чашки с LB-агаром (100 мг/мл ампициллин). Инкубировали всю ночь при 37°C.

2.2.7 Скрининг колоний

Отбор клонов, содержащих плазмиду со встроенным геном *env*, проводили методом ПЦР анализа со специфичными праймерами, обеспечивающими амплификацию гена *env* (размер ПЦР-продукта около 3000 п.о.). Для этого часть материала колонии брали микробиологической петлей, погружали в ПЦР-смесь (БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)), затем пробирки с реакционной смесью ставили в ПЦР-амплификатор. Результаты ПЦР оценивали с помощью электрофореза образцов в 1% -м агарозном геле.

2.2.8 Выделение плазмидной ДНК

Отдельную колонию клеток *E. coli*, содержащую трансформированные плазмидой клетки, вносили в 5 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и растили в течение ночи при 37°C при 170 об/мин. Затем плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток с помощью коммерческих наборов «Qiagen» или «Евроген» согласно рекомендациям производителя.

2.2.9 Трансфекция культуры клеток НЕК293

Трансфекцию культуры клеток НЕК293 рекомбинантными плазмидами рEnv совместно с коровой плазмидой рSG3Δenv (рисунок 12) проводили с использованием липофектамина 3000 (Lipofectamin 3000, Invitrogen) в формате 6-луночного планшета. Для этого, за день до трансфекции в планшеты засевались НЕК293 клетки в концентрации 1×10^6 в 3 мл полной ростовой среды DMEM в каждую лунку. На следующий день, за несколько

часов до трансфекции производили смену среды в лунках на свежую ростовую, не содержащую антибиотика. Затем подготавливали две пробирки, в каждую из которых добавляли по 125 мкл чистой среды (без сыворотки и антибиотика). Затем в первую пробирку добавляли 3,75 мкл Lipofectamin 3000 и аккуратно перемешивали. Во вторую пробирку 2,5 мкг плазмидной ДНК и 5 мкл реагента Р3000, аккуратно перемешивали. После этого, содержимое второй пробирки (среда+плазмидная ДНК+Р3000) аккуратно добавляли в первую пробирку (среда +Lipofectamin 3000), перемешивали пипетированием и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. После инкубации комплекс ДНК-липофектамин переносили к клеткам. Через 48 часов собирали псевдовирусные частицы путем фильтрации культуральной среды через 0,45-микронный фильтр; делали аликвоты по 1 мл и хранили при -80°C .

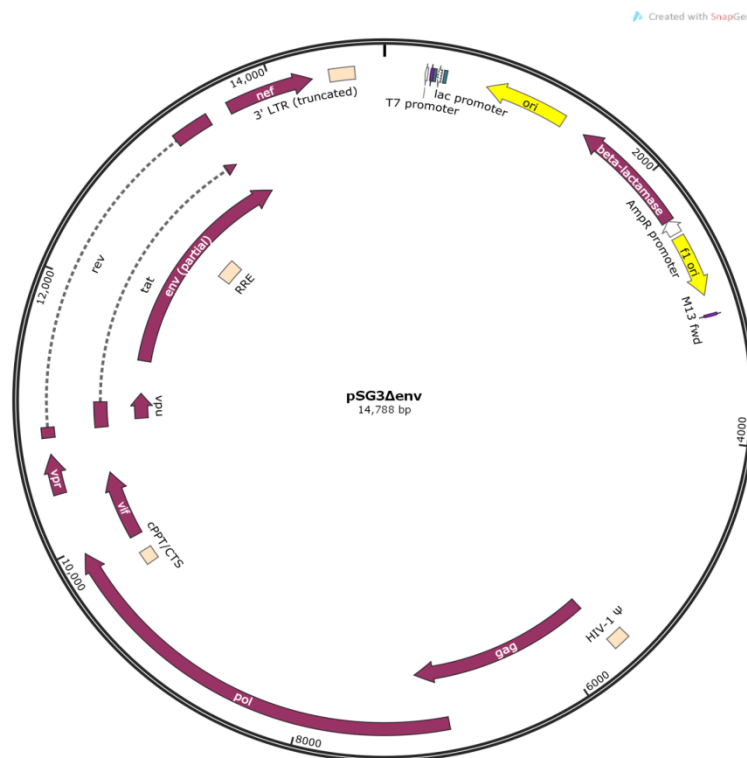


Рисунок 12 – Генетическая карта упаковочной (коровой) плазмиды pSG3Δenv.

2.2.10 Определение функциональной активности псевдовирюсов на культуре клеток TZM-bl

Функциональную активность псевдовирюсов определяли с использованием клеток TZM-bl (Revilla et al., 2011). В 96-луночный планшет вносили по 50 мкл трипсинизированной суспензии клеток TZM-bl в концентрации 1×10^5 клеток/мл среды. Затем к клеткам добавляли по 50 мкл псевдовирюс-содержащего супернатанта в четырех повторах для каждого псевдовирюса. Через 48 ч определяли уровень люминесценции с использованием системы анализа люциферазы (Luciferase Assay System, Promega). После удаления ростовой среды с клеток, инфицированных псевдовирюсами, их лизировали при помощи 50 мкл/лунка 1×буфера для лизиса клеточной культуры (Promega). Затем по 35 мкл лизата переносили в черные оптические планшеты и добавляли по 35 мкл LAR в каждую лунку. Уровень люминесценции измеряли на приборе LuMate (Awareness Technology Inc., США).

2.2.11 Определение TCID₅₀ псевдовирюсов ВИЧ-1

TCID₅₀ псевдовирюсов определяли, используя культуру клеток TZM-bl (Montefiori, 2009). В лунки 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл полной ростовой среды DMEM. В верхний ряд лунок вносили по 25 мкл псевдовирюс-содержащего супернатанта. Затем проводили серийное 5-кратное титрование супернатанта. Последний ряд лунок оставляли без псевдовирюса, как отрицательный контроль. После этого в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл трипсинизированной клеточной культуры TZM-bl в концентрации 1×10^5 кл/мл с добавлением DEAE-декстрана в концентрации 25 мкл/мл. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Через 48 часов

определяли уровень люминесценции и рассчитывали 50%- инфекционную дозу псевдовируса (TCID₅₀) по методу Рида и Мюнча.

2.2.12 Анализ вируснейтрализации с использованием *env*-псевдовирусов ВИЧ-1

Нейтрализацию псевдовирусов моноклональными антителами или тестируемыми соединениями проводили в 96-луночных культуральных планшетах по методике, описанной в (Legnani et al., 2017). Кратко: в ростовой среде DMEM готовили серийные 2-х кратные разведения моноклональных антител или тестируемых соединений, затем вносили по 200 TCID₅₀ псевдовируса в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37°C и 5 % CO₂. Затем вносили по 100 мкл трипсинизированной суспензии клеток TZM-bl в количестве 2×10^5 кл/мл. Планшеты инкубировали при 37°C и 5 % CO₂. Через 48 ч проводили учет сигнала люминесценции, как было описано в п. 2.2.10. Процент нейтрализации каждого образца вычислялся как отношение между значениями RLU тестовых лунок (тестируемый образец+псевдовирус+клетки) и контролем вируса (псевдовирус+клетки). Образцы тестировали в трех повторах, эксперимент повторяли дважды. Статистическую обработку данных и вычисление IC₅₀ проводили с использованием программы GraphPad Prism 6.

2.2.13 Секвенирование

Секвенирование генов *pol* и *env* проводили по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск). Сборку, анализ и редактирование сиквенограмм проводили с использованием программы BioEdit. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MAFFT v716.

2.2.14 Филогенетический анализ

Для определения подтипа изолятов ВИЧ-1 проводили филогенетический анализ. Филогенетический анализ был выполнен методом максимального правдоподобия с помощью программ IQ-TREE v1.6.1217 и FastTree v2.1.8. Достоверность филогенетических отношений определяли методом бутстреп-анализа (1000 бутстреп-повторений). Для построения филогенетических деревьев были включены эталонные последовательности из Лос-Аламосской базы данных последовательностей ВИЧ (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Рекомбинацию анализировали с помощью программы SimPlot 3.518.

2.2.15 Анализ мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам

Анализ мутаций устойчивости к АРП были проведен с помощью онлайн-инструмента CALIBRATED POPULATION RESISTANCE на портале HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>).

2.2.16 Определение тропности к ко-рецептору

Для определения тропизма полученных *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 использовали генотипический метод. Генотипический метод основан на определении аминокислотной последовательности V3-петли, которая отвечает за тропизм ВИЧ-1. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности V3-петли анализировали при помощи онлайн-программы – geno2pheno (<http://coreceptor.geno2pheno.org/>). В основе данного метода лежит – FPR – false positive rate – величина, определяющая вероятность, с которой данный вирус будет ложно определен как CXCR4-тропный. Чем выше показатель FPR, тем выше вероятность того, что в группе R5-тропного вируса присутствуют «чистые» CCR5-тропные вирусы.

2.2.17 Определение цитотоксичности соединений методом МТТ-теста

В основе метода МТТ лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в ДМСО. За день до проведения эксперимента в 96-луночные культуральные планшеты засеивали Tzm-bl клетки в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (10^4 клеток на каждую лунку) и помещали в CO₂-инкубатор. На следующий день, после 24 часов инкубации к культуре клеток Tzm-bl добавляли методом раститровки различные концентрации тестируемых соединений (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 и 15.6 мкМ). Каждую концентрацию выполняли в двух повторах. В контрольные лунки добавляли ДМСО в концентрации не более 1%. Конечный объем среды в лунке составлял 200 мкл. Планшет с внесенными соединениями инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 часов при 37°C и 5% CO₂. После 72 часов инкубации клеточной линии Tzm-bl с тестируемыми соединениями в каждую лунку вносили по 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали еще 2 часа в условиях CO₂-инкубатора. Через 2 часа планшеты доставали из CO₂-инкубатора, и заменяли среду в каждой лунке на раствор ДМСО (50 мкл/лунка). Планшеты аккуратно встряхивали для растворения кристаллов формаза. С помощью планшетного ридера определяли оптическую плотность каждой лунки при 570 нм. Выживаемость клеток Tzm-bl в присутствии исследуемого вещества рассчитывали по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность. Концентрацию, вызывающую 50% гибель клеток (CC₅₀), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6. Для каждого соединения был выбран диапазон нетоксичных концентраций, в которых исследовалась противовирусная активность (методика проведения описана в п. 2.2.12).

2.2.18 Исследование эффективности ингибиторов в зависимости от момента их добавления к инфицированным псевдовиром клеткам

С помощью данного эксперимента оценивали ингибирующие эффекты тестируемых соединений в разные моменты времени их добавления после инфицирования клеточной линии. Вкратце, клетки Tzm-bl высевали в 96-луночные планшеты (2×10^4 клеток/лунку). Через 24 часа к клеточному монослою добавляли псевдовирусные частицы. Затем, в различные моменты времени к клеткам добавляли исследуемые ингибиторы. В совокупности были проанализированы следующие варианты: а) добавление препаратов к клеточному монослою за час до внесения суспензии псевдовирусов; б) одновременное добавление препаратов и псевдовирусов к клеткам; в) добавление препаратов через 30, 60, 120, 180 и 240 минут после заражения клеток псевдовиром. Эффективность ингибирования псевдовирусной инфекции оценивали через 48 часов путем измерения уровня люминесценции. Образцы тестировали в трех повторах, эксперимент повторяли дважды.

2.2.19 Статистический анализ результатов

Для статистического анализа данных, построения графиков и диаграмм использовались пакеты программ GraphPad Prism 6 и Microsoft Excel 2016. Данные в таблицах и на графиках представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось ранее в литературном обзоре, для того чтобы иметь возможность быстро и адекватно оценивать разрабатываемые вакцинные конструкции, характеризовать ВИЧ-специфические антитела и потенциальные лекарственные препараты (ингибиторы проникновения), необходим надежный метод тестирования. На данный момент наилучшим образом зарекомендовала себя технология *env*-псевдовирусов. Достоинством использования данной технологии является возможность получения широкой панели псевдовирусов, экспонирующих поверхностные белки множества вирусных подтипов, а также обеспечение высокого уровня воспроизводимости результатов с учетом генетического разнообразия штаммов вируса в каждом конкретном регионе мира (de Camp et al., 2014; Montefiori et al., 2017). Однако изменчивость ВИЧ-1 требует проведения постоянной работы, направленной на получение новых псевдовирусов на основе циркулирующих штаммов ВИЧ-1, для того чтобы используемая для тестирования панель была актуальной. Поэтому вначале данной работы был проведен анализ генетического разнообразия изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территориях Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасия. Затем, на основе охарактеризованных образцов ВИЧ-1 были получены и охарактеризованы *env*-псевдовирусы. С использованием полученных псевдовирусов был проведен скрининг соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень.

3.1 Получение *env*-псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Западной Сибири

3.1.1 Анализ генетического разнообразия изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Западной Сибири

Для исследования было использовано 110 образцов сывороток крови ВИЧ-инфицированных доноров Новосибирской (n=12) и Кемеровской областей (n=19), Алтайского края (n=12), Республики Алтай (n=45) и Республики Хакасия (n=22), которые были предоставлены региональными СПИД-центрами. Каждому образцу был присвоен код, с указанием следующей информации: пол, возраст, путь передачи, прием АРТ (приложение 1). Согласно эпидемиологическим данным, доля мужчин и женщин, включенных в исследование, составила 55,45 % (61/110) и 41,81 % (46/110) соответственно; для 3,3 % (3/110) информация о гендерной принадлежности осталась неизвестной. Возраст пациентов составил от 24 до 59 лет. В 31 % случаев инфицирование происходило при внутривенном употреблении наркотиков, в 42 % случаев – половым путем при гетеросексуальных контактах, для 31 % информация осталась неизвестной. Доля пациентов, принимающих АРТ, составила 14 % (13/110).

Из сывороток ВИЧ-положительных индивидуумов был выделен общий пул РНК с использованием коммерческого комплекта реагентов. Затем образцы РНК использовали для обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции для получения кДНК и амплифицированных фрагментов генов *pol* и *env* ВИЧ-1.

Вначале была проведена обратная транскрипция и амплификация участка PR-RT гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1 (праймеры и условия амплификации см. в разделе Материалы и методы). Всего было амплифицировано 59 вариантов PR-RT области различных изолятов ВИЧ-1. После проведения ПЦР области PR-RT,

продукты амплификации анализировали в 1%-ом агарозном геле. На рисунке 13 приведены результаты анализа образцов из Новосибирской области.

Далее проводили определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов PR-RT с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Полученные секвенограммы анализировали с помощью программы BioEdit. Информативные нуклеотидные последовательности, которые в дальнейшем были использованы для филогенетического и рекомбинационного анализов, были получены для 11 образцов из Алтайского края, 18 из Кемеровской области, 11 из Новосибирской области, 15 из Республики Алтай и 4 из Республики Хакасия.

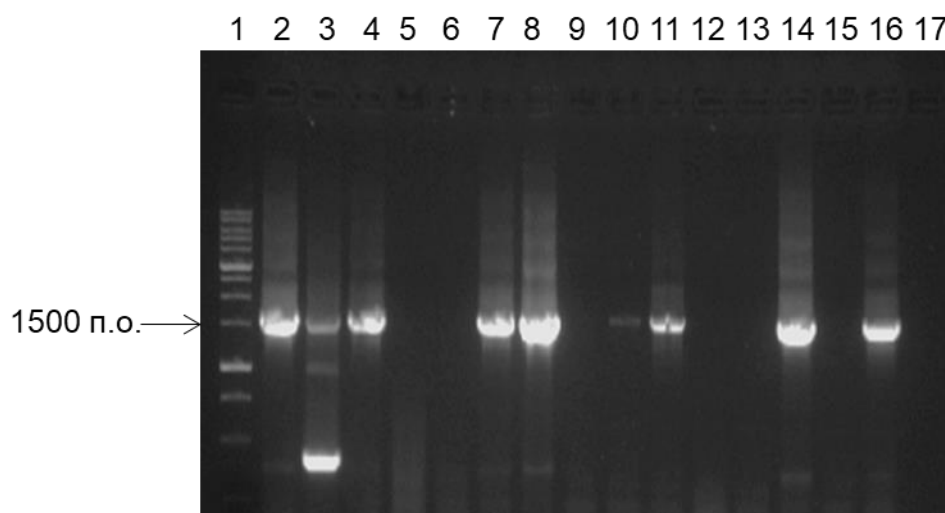
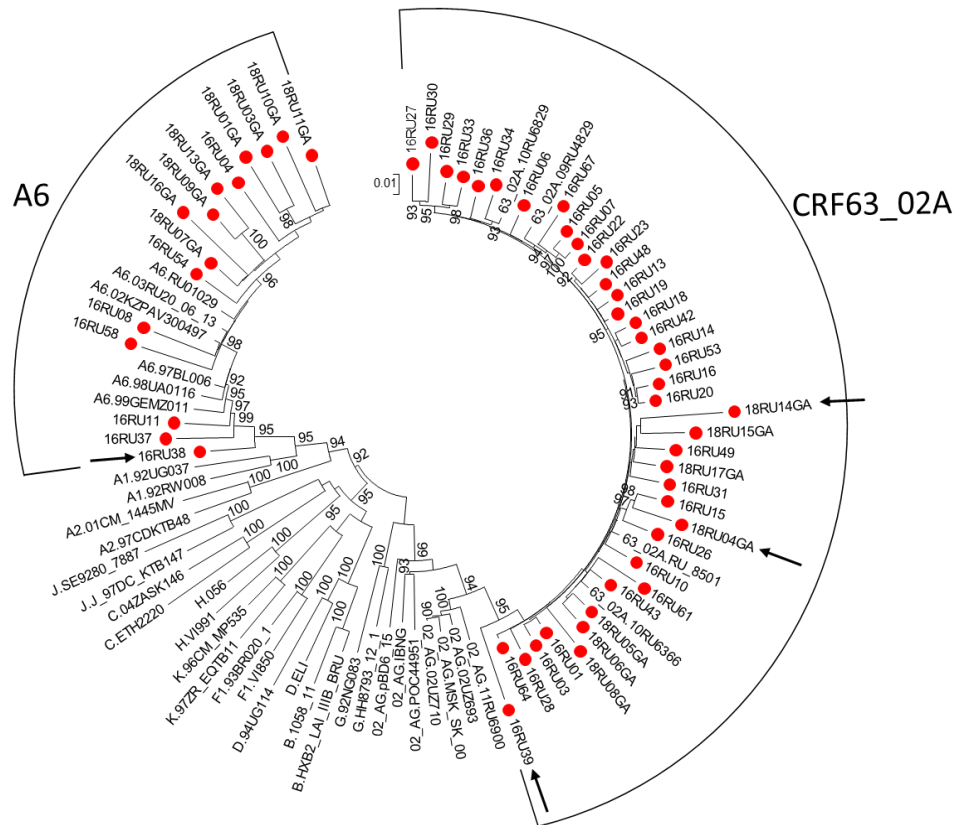


Рисунок 13 – Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР области PR-RT изолятов ВИЧ-1 из Новосибирской области (размер ПЦР-продукта – 1500 п.о.): 1 – маркер молекулярного веса ДНК М12 (СибЭнзим, Россия); 2, 4, 7, 8, 10, 11, 14, 16 – положительные образцы; 3, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 15 – отрицательные образцы; 17 – отрицательный контроль (вода).

Филогенетический анализ с использованием программы IQ-TREE показал (рисунок 14А), что в Новосибирской и Кемеровской областях, Алтайском крае и Республике Хакасия более чем в 70% случаев встречается рекомбинантная форма CRF63_02A ВИЧ-1, которая продолжает доминировать на юге Западной Сибири; подтип А6 встречается менее чем в 30% случаев (Shcherbakova et al., 2014; Gashnikova et al., 2017; Казеннова и др., 2020). В то же время, в Республике Алтай наблюдается несколько иная картина

в распределении подтипов ВИЧ-1 – более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу A6, а доля CRF63_02A составляет 33%. Распределение подтипов по регионам представлено на рисунке 14Б.

А



Б

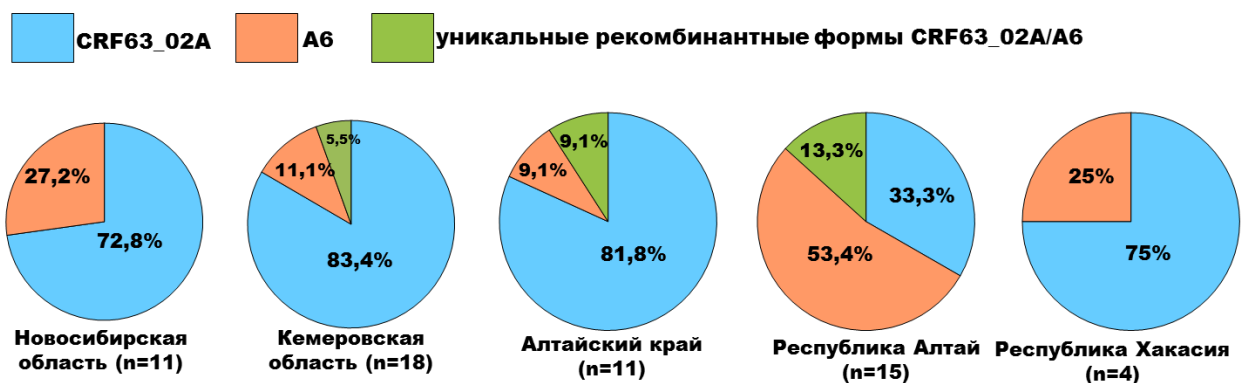


Рисунок 14 – А – Филогенетическое дерево максимального правдоподобия последовательностей PR-RT исследованных изолятов ВИЧ-1 Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края и Республики Алтай (построено с использованием IQ-TREE), стрелками обозначены рекомбинантные формы CRF63_02A/A6; Б – Распределение подтипов ВИЧ-1 по исследуемым регионам.

С помощью рекомбинационного анализа, среди изолятов, циркулирующих на территориях Кемеровской области, Алтайского края и Республики Алтай, в единичных случаях были обнаружены уникальные рекомбинантные формы CRF63_02A/A6, геномы которых имеют участки, частично идентичные референсным последовательностям CRF63_02A, частично идентичные подтипу A6 (рисунок 15). Подобные рекомбинанты обнаружены в Сибири и описаны в литературе (Gashnikova et al., 2015; Gashnikova et al., 2017; Kostaki et al., 2018; Казеннова и др., 2020).

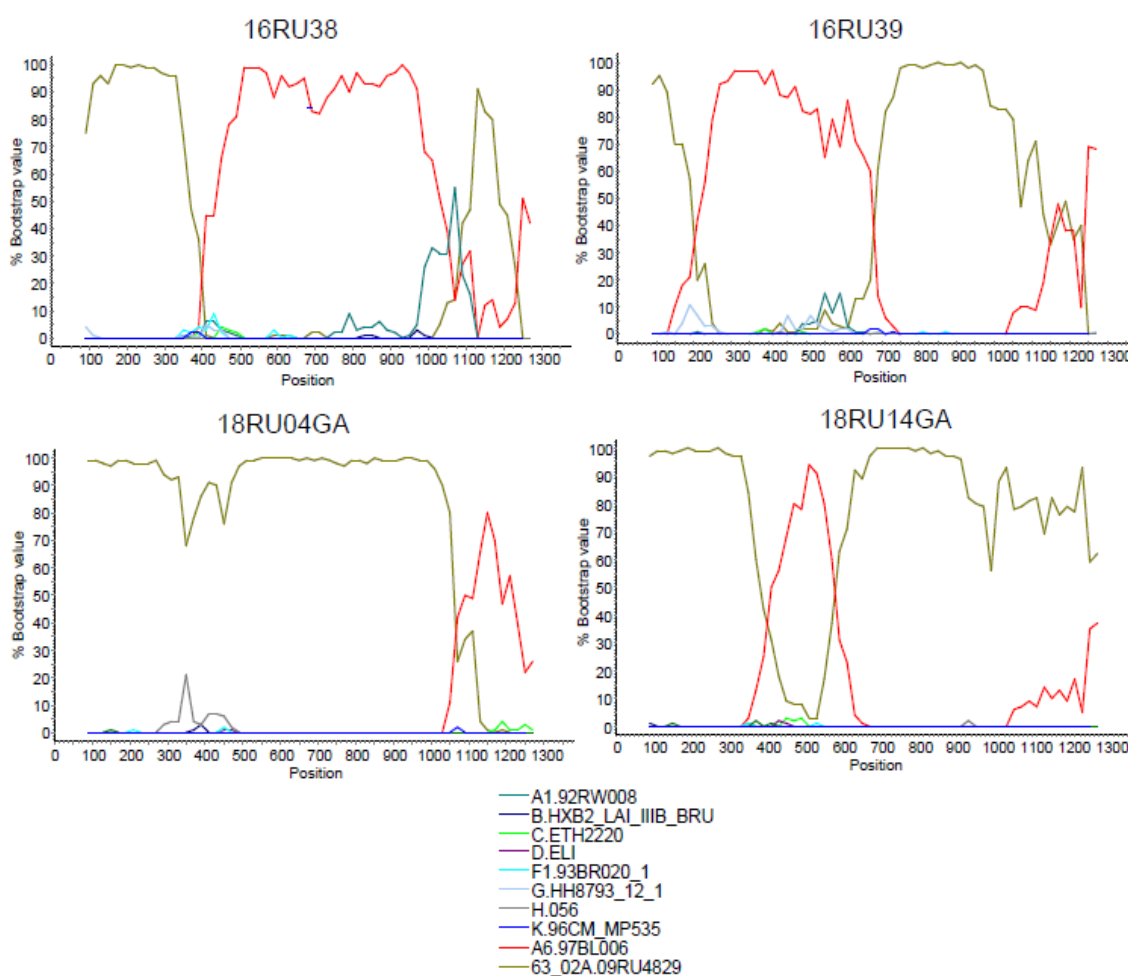


Рисунок 15 – Рекомбинационный анализ четырёх последовательностей PR-RT CRF63_02A/A6. На горизонтальной оси отмечено положение нуклеотидов, начиная с 1 нуклеотида участка, кодирующего протеазу; по вертикальной оси отмечен процент кластеризации с кладами ВИЧ-1, использованными в анализе.

После определения субтипической принадлежности изолятов ВИЧ-1, полученные нуклеотидные последовательности были проанализированы на предмет наличия мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам с помощью онлайн-инструмента Calibrated Population Resistance на портале HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>). Мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью к ингибиторам протеазы (ИП), в проанализированных нуклеотидных последовательностях обнаружено не было. Большинство исследованных образцов содержали в гене протеазы полиморфные мутации K20I (70%), L10I/V (22%) и V11I (2%). Необходимо отметить, что к полиморфным относятся мутации, которые способны влиять на приспособленность вируса, как при наличии, так и при отсутствии мутаций устойчивости, и строго говоря, являются нейтральными и не ассоциированы с возникновением лекарственной устойчивости (Shafer et al., 2007). Относительно сегмента обратной транскриптазы были выявлены мутации устойчивости к ингибиторам обратной транскриптазы – НИОТ (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) и ННИОТ (ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) (таблица 3). Среди мутаций устойчивости к препаратам НИОТ были обнаружены мутации M41L и K65R. Среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к препаратам ННИОТ, была выявлена мутация K103N. Обнаруженные мутации резистентности к группе препаратов НИОТ и ННИОТ были выявлены среди пациентов, не принимающих антиретровирусную терапию. У одного пациента в совокупности было обнаружено две мутации резистентности к АРП: K65R и K103N.

Таблица 3 – Мутации устойчивости к НИОТ и ННИОТ исследованных вариантов ВИЧ-1

Код образца	Подтип	Мутации устойчивости к АРП		Устойчивость к АРП (Н: низкая; С: средняя; В: высокая)
		НИОТ	ННИОТ	
16RU15	CRF63_02A	K65R	-	ABC (C), FTC (C), 3TC (C), TDF (B)
16RU22	CRF63_02A	M41L	-	AZT (H)
16RU28	CRF63_02A	-	K103N	EFV (B), NVP (B)
16RU39	CRF63_02A/A6	-	K103N	EFV (B), NVP (B)
16RU64	CRF63_02A	M41L	-	AZT (H)
18RU03GA	A6	K65R	K103N	ABC (C), FTC (C), 3TC (C), TDF (B), EFV (B), NVP (B)

ABC – абакавир, FTC – эмтрицитабин, 3TC – ламивудин, TDF – тенофовир, AZT – азидотимидин, EFV – эфавиренц, NVP – невирапин

Нуклеотидные последовательности (n=55) области *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы, были депонированы в GenBank под номерами доступа – MT101799-MT101834 и MT811096-MT811114.

3.1.2 Амплификация гена *env* и его клонирование в составе экспрессионного вектора

После того, как был проведен анализ генетического разнообразия изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на юге Западной Сибири и установлены доминирующие подтипы и рекомбинантные формы вируса, следующая задача состояла в получении *env*-псевдовирусов и их характеристике.

Для этого, в начале получали ДНК-фрагменты, кодирующие ген *env*, с помощью обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с использованием в качестве матрицы выделенные образцы РНК ВИЧ-1 из Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасии. На рисунке 16 представлены репрезентативные образцы – продукты ПЦР, полученные для образцов из Республики Алтай. В результате амплификации было получено 33 полноразмерных варианта гена *env* изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа.

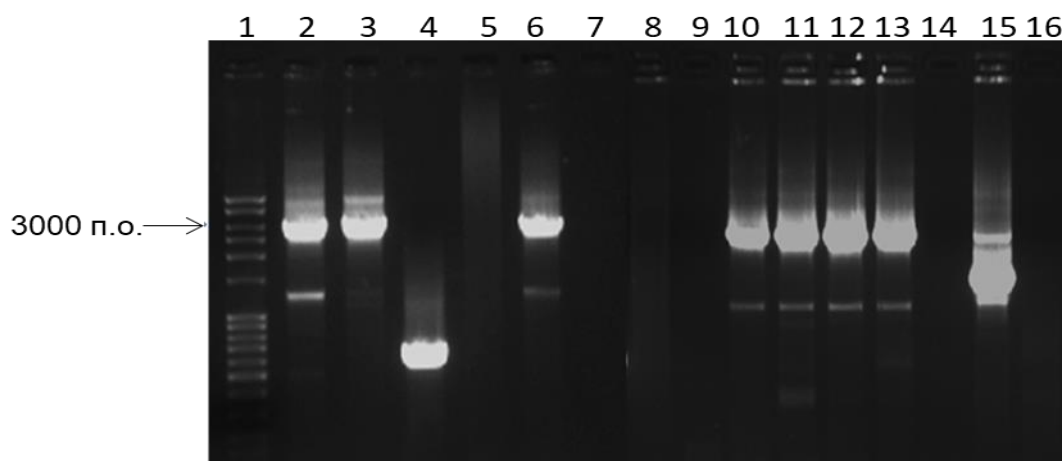


Рисунок 16 – Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР на область *env* изолятов из Республики Алтай (размер ПЦР-продукта – 3000 п.о.): 1 – маркер молекулярного веса ДНК 100 bp DNA Ladder Plus («PlasmidFactory», Германия); 2, 3, 6, 10, 11, 12, 13 – положительные образцы; 4, 5, 7, 8, 9, 14, 15 – отрицательные образцы; 16 – отрицательный контроль (вода).

Далее, после электрофоретического разделения продуктов амплификации в агарозном геле, фрагменты геля, соответствующие целевому фрагменту ДНК, вырезали и производили процедуру очистки фрагментов ДНК из агарозного геля.

После этого, получали генетические конструкции, несущие варианты полноразмерного гена *env*. Для этого проводили клонирование очищенных ПЦР-продуктов в составе экспрессионного вектора pcDNA3.1/V5-His TOPO в соответствии с рекомендациями производителя. Отбор клонов, содержащих вставку, проводили методом ПЦР со специфичными праймерами, обеспечивающими амплификацию гена *env*. После проведения ПЦР, реакционную смесь разделяли в 1%-м агарозном геле (рисунок 17). Для каждого варианта *env* было получено от одного до четырех положительных клонов.

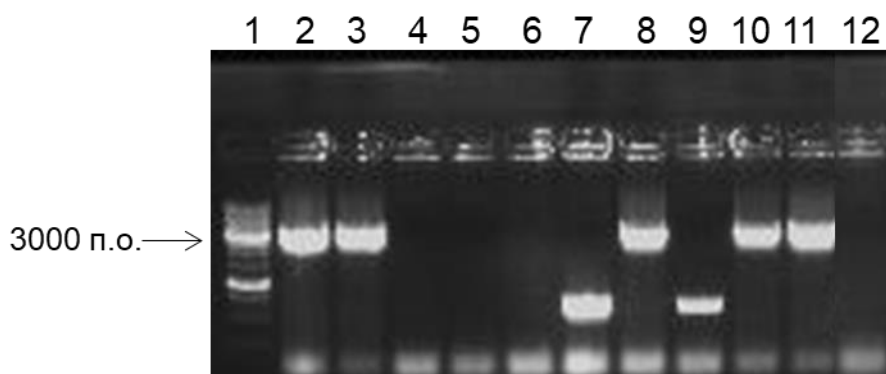


Рисунок 17 – Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР после скрининга колоний варианта *env* 19RU46GA: 1 – маркер молекулярного веса ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); 2, 3, 8, 10 – положительные клоны; 4, 5, 6, 7, 9 – клоны без вставки; 11 – положительный контроль (плазмида со вставкой гена *env*); 12 – отрицательный контроль (вода).

Далее проводили наработку и выделение плазмидной ДНК положительных клонов. Наличие целевой встройки и целостность открытой рамки трансляции гена *env* в полученных генетических конструкциях подтверждали рестрикционным анализом (рисунок 18) и секвенированием.

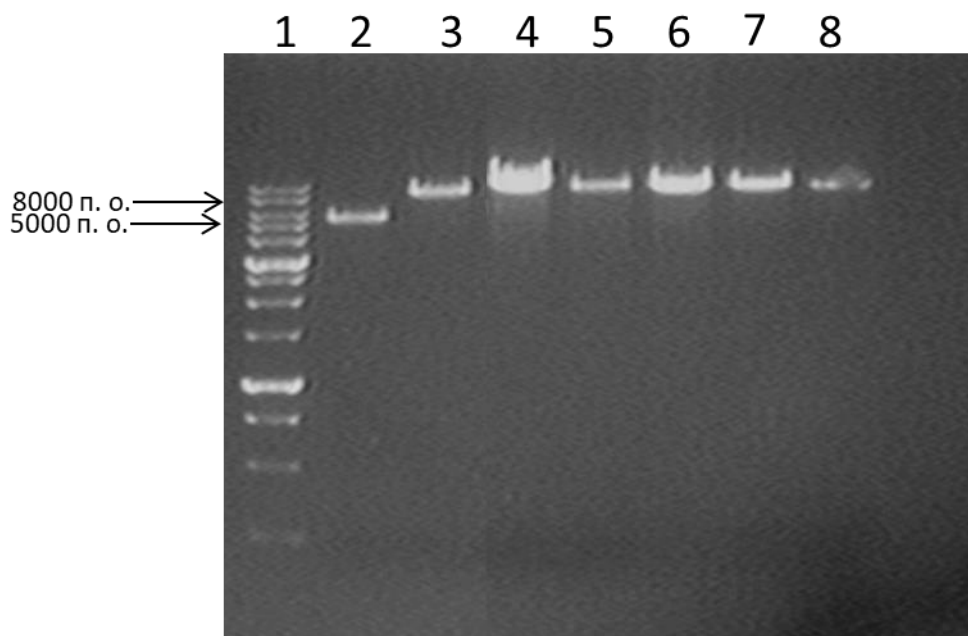


Рисунок 18 – Электрофореграмма разделения продуктов рестрикционного анализа генетических конструкций, содержащих полноразмерный ген *env*: 1 – маркер молекулярного веса ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); 2 – линейаризованный плазмидный вектор pcDNA3.1/V5-His TOPO TA без вставки (5523 п. о.), обработанный эндонуклеазой рестрикции *EcoR* V; 3, 4, 5, 6, 7, 8 –

линеаризованные плазмиды рEnv (8523 п. о.), несущие варианты гена *env*, и обработанные эндонуклеазой рестрикции *EcoR* V.

Для получения псевдовиральных частиц была проведена котрансфекция культуры клеток НЕК293 двумя плазмидами: одной из сконструированных плазмид, несущей ген *env* (рEnv) и коровой плазмидой рSG3Δenv. Через двое суток собирали урожай псевдовирусов и проводили их характеризацию. Сборку и выход псевдовиральных частиц подтверждали методом электронной микроскопии (рисунок 19).

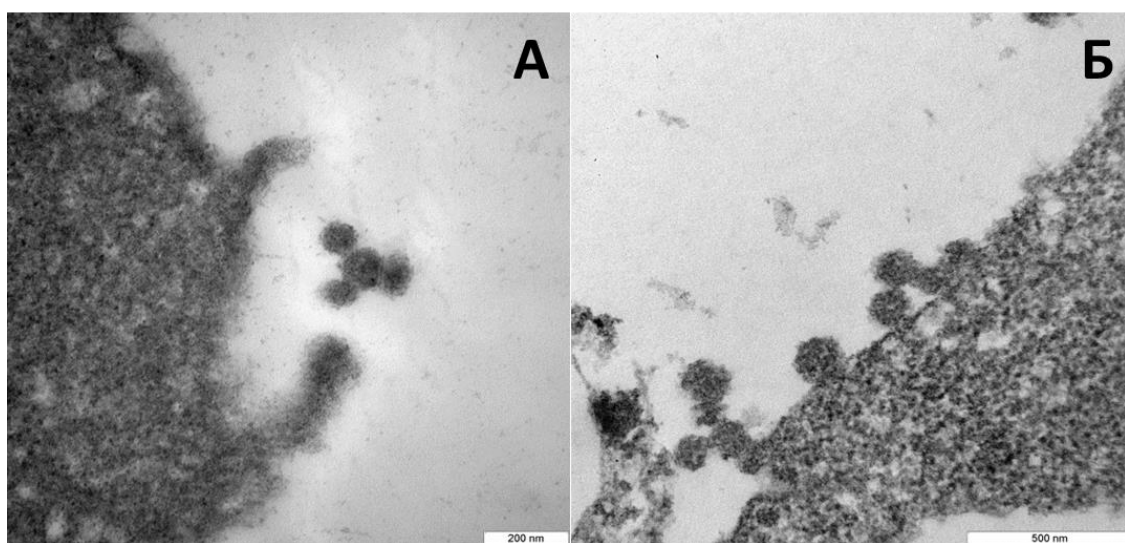


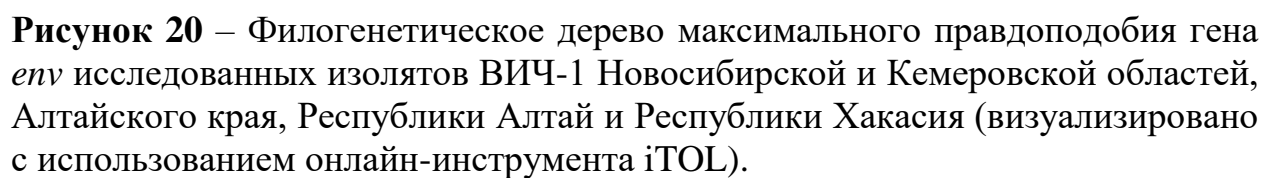
Рисунок 19 – А – Электронная микрофотография клеток 293Т после трансфекции с отпочковавшимися псевдовиральными частицами. Б – Псевдовиральные частицы разной степени созревания. Электронные микрофотографии сделаны Зайцевым Б.Н. и Тарановым О.С.

Характеризацию каждого псевдовируса проводили по следующим параметрам: 1) определяли субтипическую принадлежность и тропность к ко-рецептору (CCR5 или CXCR4) путем анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена *env* в составе полученных рекомбинантных плазмид рEnv, 2) определяли функциональную активность псевдовирусов, и 3) определяли чувствительность полученных псевдовирусов к нейтрализации известными моноклональными широконейтрализующими антителами.

С помощью секвенирования по методу Сэнгера были определены нуклеотидные последовательности амплифицированных вариантов *env*. Полученные секвенограммы анализировали с помощью программы BioEdit. В

результате были получены нуклеотидные последовательности *env*, соответствующие целевому фрагменту ДНК, – для четырёх образцов из Алтайского края, 10 из Кемеровской области, трёх из Новосибирской области, 13 из Республики Алтай и трёх из Республики Хакасия. Филогенетический анализ показал, что 26 вариантов полноразмерного гена *env* относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A и 7 вариантов к подтипу A6 (рисунок 20). Анализ нуклеотидной последовательности V3-петли с использованием онлайн-программы Geno2pheno [coreceptor] 2.5 показал, что 31 изолят ВИЧ-1 является CCR5-тропным, один изолят обладает двойной тропностью R5/X4 и один изолят является CXCR4-тропным.

Функциональную активность клонов псевдовирюсов определяли по их способности инфицировать клеточную линию TZM-bl (Revilla et al., 2011). TZM-bl является стабильной, генетически модифицированной клеточной линией HeLa, на поверхности которой локализованы рецептор CD4 и ко-рецепторы CCR5 и CXCR4. В геном клеточной линии TZM-bl интегрированы репортерные гены люциферазы светлячка и β -галактозидазы *E. coli* под транскрипционным контролем длинного концевой повтора ВИЧ-1. При проникновении вириона ВИЧ-1 или *env*-псевдовирюса в клетку-мишень TZM-bl, в ответ на синтез вирусного белка Tat, запускается экспрессия репортерного гена люциферазы и происходит повышение уровня люминесценции клетки, что соответствует проникновению псевдовирюсных частиц в клетки-мишени (см. схему, представленную на рисунке 11). Клоны псевдовирюсов отбирались как функциональные и пригодные для дальнейшей работы при уровне люминесценции, превышающей пороговый сигнал, как минимум, в 50 раз (Revilla et al., 2011). В качестве положительного контроля использовали *env*-псевдовирюс SF162.LS подтипа В из референсной международной панели псевдовирюсов.



Функциональный анализ полученных клонов псевдовирусов показал, что сборка функционально-активных псевдовирусных частиц происходит для 13 вариантов псевдовирусов из 33 (с общим числом проанализированных

клонов равным 66) (таблица 4). Мы предположили, что одной из возможных причин отсутствия функциональной активности отдельных вариантов псевдовирусов могут быть нуклеотидные замены и делеции в гене *env*, которые произошли на этапе клонирования. Для этого было проведено повторное секвенирование полученных рEnv плазмид. Детальный анализ нуклеотидных последовательностей *env* в ряде случаев выявил стоп-кодоны, наличие которых приводило к подавлению трансляции и остановке синтеза gp160, и как следствие невозможности презентации тримерных комплексов Env на поверхности вирусных частиц. Однако у некоторых вариантов функционально неактивных псевдовирусов, стоп-кодонов внутри рамки считывания гена *env* обнаружено не было. В данном случае, низкая экспрессия гена Env, вероятно, вызвана наличием разбросанных cis-элементов в плазмидном векторе, которые удерживают РНК в ядре.

Таблица 4 – Функциональная активность сконструированных псевдовирусов ВИЧ-1

Код образца	Подтип	Тропность к ко-рецептору	№ клона	Уровень люминесценции над клетками, раз)	Регион
16RU07	CRF63_02A	R5	7	2	Новосибирская область
16RU11	A6	R5	5	62	
			6	7	
			7	2	
			8	3	
16RU12	CRF63_02A	R5	6	33	
			12	166	
16RU13	CRF63_02A	R5	6	300	Кемеровская область
16RU18	CRF63_02A	R5	1	2	
16RU19	CRF63_02A	R5	11	20	
			12	262	
			16	2	
16RU20	CRF63_02A	R5	2	2	
			6	72	
			9	198	
16RU21	CRF63_02A	R5	8	250	
			12	2	
16RU22	CRF63_02A	R5	3	2	
			8	111	
16RU23	CRF63_02A	R5	3	2	
			5	963	
			8	1	
16RU27	CRF63_02A	R5	6	50	Алтайский край
			10	5	
			12	2	
16RU28	CRF63_02A	R5	3	50	
			6	2	
16RU35	CRF63_02A	R5	1	50	
			7	2	
			10	2	
16RU36	CRF63_02A	R5	5	2	
			7	166	
16RU39	CRF63_02A	R5	1	2	Кемеровская область
16RU49	CRF63_02A	R5	2	1	
			4	1	
			5	1	
16RU54	A6	R5	1	2	Кемеровская область
			10	211	

Продолжение таблицы 4

Код образца	Подтип	Тропность к ко- рецептору	№ клона	Уровень люминесценции над клетками, раз)	Регион
18RU05GA	CRF63_02A	R5	1	2	Республика Алтай
18RU06GA	CRF63_02A	R5/X4	1	2	
18RU07GA	CRF63_02A	R5	15	2	
			19	1	
			21	1	
18RU09GA	A6	н.а.	1	1	
18RU10GA	A6	R5	1	1	
18RU18GA	CRF63_02A	R5	6	2	
			15	2	
19RU20GA	CRF63_02A	R5	1	1	
19RU21GA	CRF63_02A	R5	1	1	
19RU22GA	CRF63_02A	R5	2	2	
			4	2	
19RU23GA	CRF63_02A	R5	15	1	
			16	2	
19RU34GA	CRF63_02A	R5	1	1	
19RU46GA	CRF63_02A	R5	1	1	
			6	2	
			9	1	
			10	1	
19RU47GA	A6	R5	26	2	
20RU21KHA	A6	н.а.	1	1	Республика Хакасия
20RU24KHA	A6	R4	15	1	
20RU25KHA	CRF63_02A	R5	2	1	
			6	4	
			7	2	
			9	1	
SF162.LS	B	R5	1	300	Референсная панель псевдовирuсов

Варианты 16RU07, 16RU11, 16RU12, 16RU13, 16RU18, 16RU19, 16RU20, 16RU21, 16RU22, 16RU23, 16RU27, 16RU28, 16RU35, 16RU36, 16RU39, 16RU49, 16RU54 были получены совместно со Щербаковой Н.С.

Среди 13 функционально-активных вариантов псевдовирuсов – 11 вариантов принадлежат к рекомбинантной форме CRF63_02A и два варианта к подтипу A6. Все варианты псевдовирuсов являются CCR5-тропными (таблица 5).

Таблица 5 – Характеристика функционально-активных псевдовирусов

Код образца	Регион	Подтип	Ко-рецептор
16RU11	Новосибирская обл.	A6	CCR5
16RU12	Новосибирская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU13	Кемеровская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU19	Кемеровская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU20	Кемеровская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU21	Кемеровская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU22	Кемеровская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU23	Кемеровская обл.	CRF63_02A1	CCR5
16RU27	Алтайский край	CRF63_02A1	CCR5
16RU28	Алтайский край	CRF63_02A1	CCR5
16RU35	Алтайский край	CRF63_02A1	CCR5
16RU36	Алтайский край	CRF63_02A1	CCR5
16RU54	Кемеровская обл.	A6	CCR5

Псевдовирусы, обладающие функциональной активностью были исследованы в реакции вируснейтрализации с антителами, обладающими способностью нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (bnAbs). Для анализа были использованы bnAbs, полученные из коллекции NIH по программе AIDS Reagent Programm: VRC01 и 2G12 (сайт взаимодействия с рецептором CD4), PG9 и PG16 (V1/V2 петля), PGT126 (область V3 петли), 2F5, 4E10, 10E8 (MPER область gp41). В качестве контроля для сравнения были использованы охарактеризованные псевдовирусы из международной референсной панели псевдовирусов ВИЧ-1 – 6535.3 (подтип В, уровень чувствительности 1), TRO.11 (подтип В, уровень чувствительности 2) и pTRJO4551.58 (подтип В, уровень чувствительности 3). Статистическую обработку данных и определение IC50 проводили с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

Согласно результатам нейтрализации, представленным в виде тепловой карты (рисунок 21), большинство псевдовирусов оказались чувствительными к нейтрализации МАК VRC01 (сайт взаимодействия с рецептором CD4), PGT126 (область V3 петли) и 10E8 (MPER область gp41); проявили умеренную чувствительность к нейтрализации МАК PG9 (V1/V2 петля) и 4E10 (MPER область gp41) и оказались устойчивыми к нейтрализации МАК 2G12 (сайт

взаимодействия с рецептором CD4), PG16 (V1/V2 петля) и 2F5 (MPER область gp41). Сравнивая полученные результаты с данными по чувствительности к нейтрализации широконейтрализующими антителами для других подтипов ВИЧ-1, необходимо отметить, что и вирусы подтипов В, С, рекомбинантной формы CRF02_AG также проявляют наибольшую чувствительность к нейтрализации такими антителами, как VRC01 и 10E8, и устойчивость к нейтрализации антителами 2G12, PG9, PG16, 2F5 (Li et al., 2005; Hraber et al., 2017; Stefić et al., 2019).

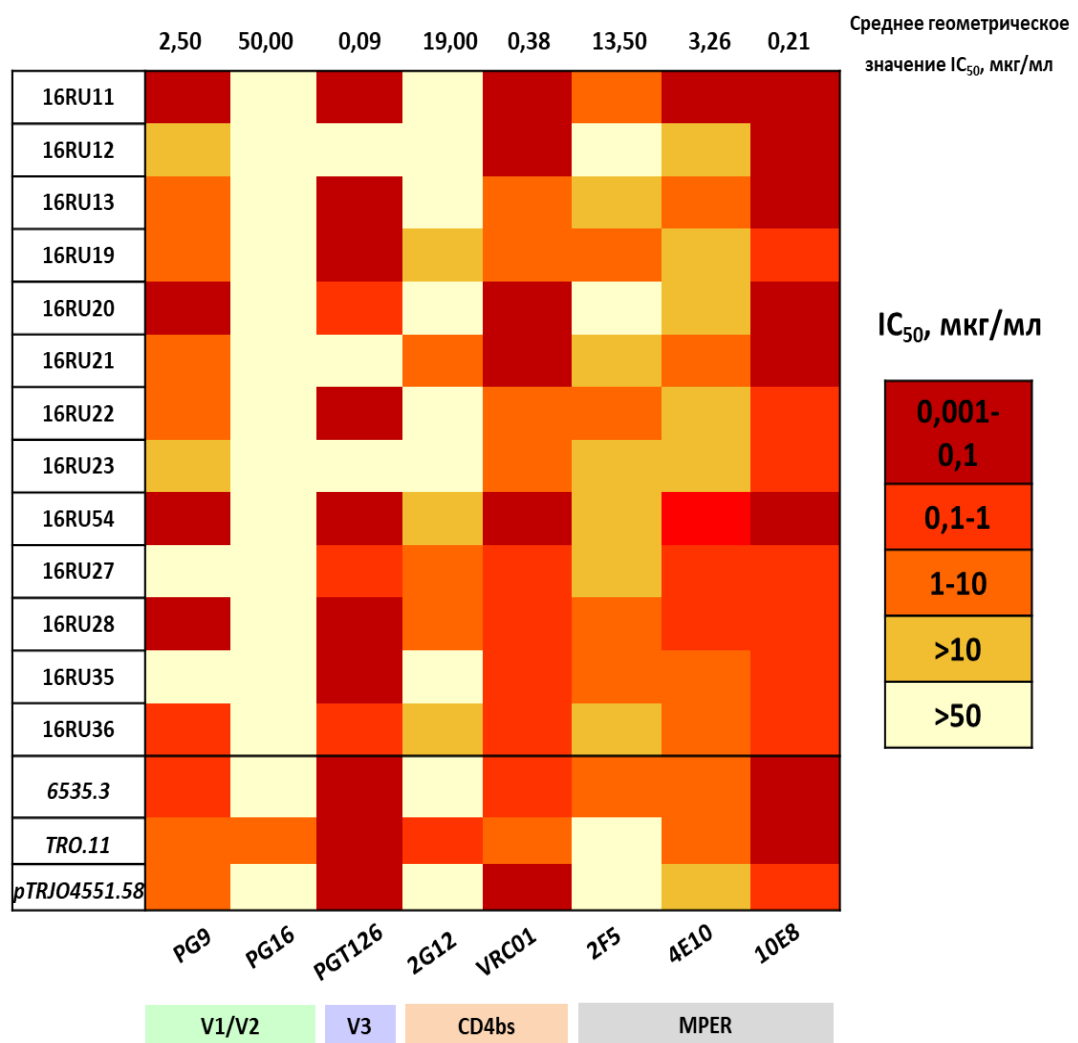


Рисунок 21 – Чувствительность *env*-псевдовирусов к нейтрализации моноклональными широконейтрализующими антителами. V1/V2, V3, CD4bs, MPER – регионы уязвимости ВИЧ-1 на поверхности Env. V1/V2 – регион уязвимости, включающий N-связанные гликаны в позиции Asn160; V3 – регион уязвимости, который включает N-связанные гликаны в позиции Asn332; CD4bs – участок прикрепления gp120 к CD4; MPER – регион уязвимости, находящийся на С-конце трансмембранного гликопротеина gp41.

Таким образом, в результате проделанной работы была проведена комплексная характеристика образцов, использованных для конструирования псевдовирусов, то есть, собраны и каталогизированы образцы сывороток, полученные из Центров по профилактике и борьбе со СПИД Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасия, необходимые для получения образцов РНК и кДНК ВИЧ-1. Амплифицировано и проанализировано 59 последовательностей гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ. С помощью филогенетического анализа установлено, что рекомбинантная форма CRF63_02A продолжает доминировать на юге Западной Сибири (Новосибирская и Кемеровская области, Алтайский край и Республика Хакасия). В Республике Алтай, напротив, более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу А6. Нуклеотидные последовательности гена *pol* проанализированы на предмет наличия мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам. Мутаций резистентности к ингибиторам протеазы в проанализированных образцах не обнаружено. В сегменте обратной транскриптазы обнаружены мутации резистентности к НИОТ (M41L и K65R) и ННИОТ (K103N). Нуклеотидные последовательности (n=55) области *pol* были депонированы в GenBank под номерами доступа – MT101799-MT101834 и MT811096-MT811114. Получено 13 *env*-псевдовирусов, из которых 11 относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A и 2 к подтипу А6 ВИЧ-1; все варианты являются CCR5-тропными. Характеризация полученных псевдовирусов с помощью широконейтрализующих антител показала, что большинство псевдовирусов чувствительны к нейтрализации МАК VRC01, PGT126 и 10E8; проявили умеренную чувствительность к нейтрализации МАК PG9 и 4E10 и оказались устойчивыми к нейтрализации МАК 2G12, PG16 и 2F5.

3.2 Использование псевдовирусов ВИЧ-1 для поиска соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень

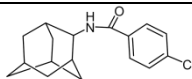
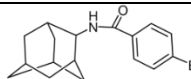
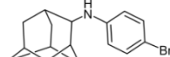
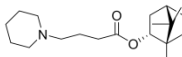
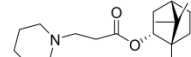
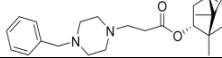
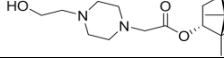
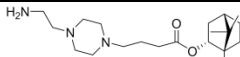
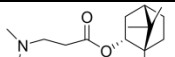
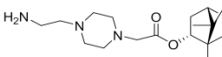
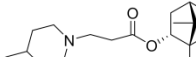
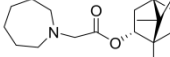
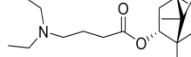
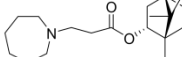
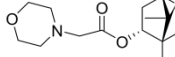
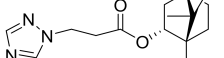
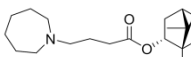
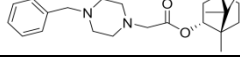
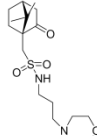
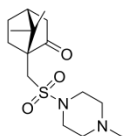
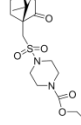
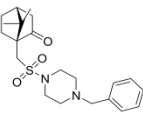
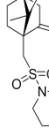
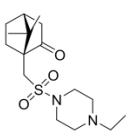
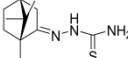
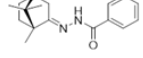
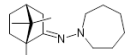
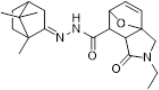
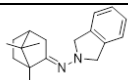
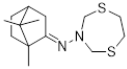
Следующей частью данной работы стали эксперименты по использованию псевдовирусов для скрининга соединений с целью поиска таких веществ, которые были бы способны ингибировать слияние ВИЧ с клетками, предотвращая, таким образом, проникновение вируса.

В качестве объекта исследования были выбраны производные терпеноидов, которые обладают ингибирующей активностью против ряда вирусов. В частности, было установлено, что производные терпеноидов блокируют процессы проникновения вируса гриппа (Sokolova et al., 2017), обладают высокой активностью против филовирусов (Kononova et al., 2017; Sokolova et al., 2019) и ортопоксвирусов (Sokolova et al., 2018). Однако противовирусная активность производных данного класса соединений в отношении ВИЧ-1, до настоящего времени изучена не полностью, в то время как некоторые из веществ, показали потенциальную эффективность. В частности, в ряде работ была продемонстрирована противовирусная активность производных бетулиновой кислоты (Aiken, Chen, 2005; Lai et al., 2008; Huang et al., 2018; Kazakova et al., 2018). Сообщается, что данные соединения могут влиять как на слияние вируса с клеткой-мишенью, так ингибировать активность обратной транскриптазы и сборку вируса (Aiken, Chen, 2005; Lai et al., 2008; Huang et al., 2018; Kazakova et al., 2018). Интересно также отметить, что в 90-х годах 20 века появились работы зарубежных и российских ученых, в которых описывается анти-ВИЧ-1 активность тритерпенового сапонина – глицирризиновой кислоты в отношении изолятов ВИЧ-1 (Hirabayashi et al., 1991; Плясунова и др., 1992). Однако позднее Sasaki с соавторами показали, что глицирризиновая кислота воздействует на вирус не напрямую, а ингибирует репликацию ВИЧ-1 в культуре МКПК, индуцируя продукцию β -хемокинов, которые связываются с CCR5 хемокиновым рецептором, и тем самым предотвращают проникновение вируса в клетки

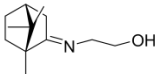
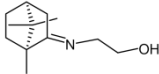
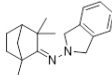
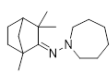
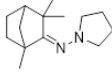
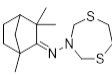
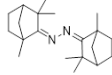
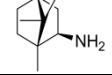
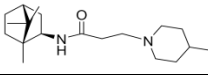
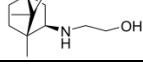
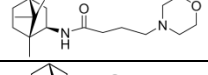
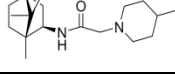
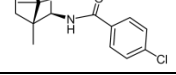
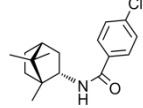
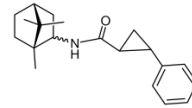
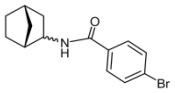
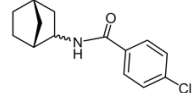
МКПК (Sasaki et al., 2002). Среди производных глицирризиновой кислоты были обнаружены производные, обладающие анти-ВИЧ активностью. К ним относят амид глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом (Патент РФ 2199547, 2003), пента-О-никотинат глицирризиновой кислоты (Патент РФ 2363703, 2009), ди- и/или триникотинаты глицирризиновой кислоты и их соли (Патент РФ 2304145, 2007; Патент РФ 2376312, 2009).

В данной работе был проведен анализ противовирусной активности библиотеки соединений, полученных на основе природных терпеноидов и их производных, любезно предоставленных Яровой О.И. (д-р хим. наук) и сотрудниками лаборатории физиологически активных веществ Института Органической Химии (НАОХ СО РАН). В библиотеку соединений было включено 47 соединений, которые являются производными адамантана, изоборниламина, норборниламина, сложноэфирными N-гетероциклическими производными (-)-борнеола, N-содержащими производными (+)-камфоры и (-)-фенхона (таблица 6). Выбор данных классов соединений был основан на том, что некоторые из представителей показали свою высокую противовирусную активность. Так, производные адамантановых амидов оказались активны в отношении вируса осповакцины (Suslov et al., 2020); среди сложных эфиров борнеола были обнаружены соединения, проявляющие активность против ортопоксвирусов (Sokolova et al., 2018), филовирусов (Kononova et al., 2017) и вирусов гриппа А (Sokolova et al., 2017); производные 10-камфоросульфокислоты проявили ингибирующие свойства против вируса Эбола и вируса Марбург (Sokolova et al., 2019); иминопроизводные камфоры и производные гидразона камфоры проявили противовирусные свойства против вируса гриппа А (Sokolova et al., 2017; Sokolova et al., 2015; Kovaleva et al., 2021).

Таблица 6 – Структурные формулы исследуемых соединений

Номер соединения	Структура	Номер соединения	Структура
2-адамантановые амиды и амины			
1		3	
2			
Сложноэфирные производные (-)-борнеола			
4		12	
5		13	
6		14	
7		15	
8		16	
9		17	
10		18	
11			
Производные 10-камфоросульфокислоты			
19		22	
20		23	
21		24	
Производные гидразона камфоры			
25		28	
26		29	
27		30	

Продолжение таблицы 6

Иминопроизводные камфоры			
31		32	
Производные фенхона			
33		36	
34		37	
35			
Производные изоборниламина			
38		42	
39		43	
40		44	
41		45	
Производные норборниламина			
46		47	

Помимо этого, противовирусная активность была исследована для 11 препаратов, один из которых является природной глицирризиновой кислотой (ГК), выделяемой из солодки (номер соединения 48) (рисунок 22А), и 10 препаратов, которые представляют собой смесь никотинатов глицирризиновой кислоты, и являются преимущественно триникотинатами. Для триникотинатов глицирризиновой кислоты применима общая структурная формула, представленная на рисунке 22Б. Среди 10 препаратов триникотинатов глицирризиновой кислоты (которым были присвоены номера от 49 до 58), три препарата представляли собой дегидратированные формы никотинатов (номера препаратов 56, 57, 58). В этих соединениях в гликозидном фрагменте было проведено дегидратирование с образованием соединений со структурной формулой, представленной на рисунке 22В.

Данные препараты отличались друг от друга вариантами синтеза и обработки реакционной смеси. На сегодняшний день, коллегами из НИОХ СО РАН разрабатываются подходы к синтезу индивидуальных компонентов, содержащих заведомо известное количество и место присоединения фрагментов никотиновой кислоты в сахарном остатке. Данная задача крайне сложная с синтетической точки зрения, поскольку гидроксильные группы в гликозидном фрагменте практически равнозначны с точки зрения их реакционной способности.

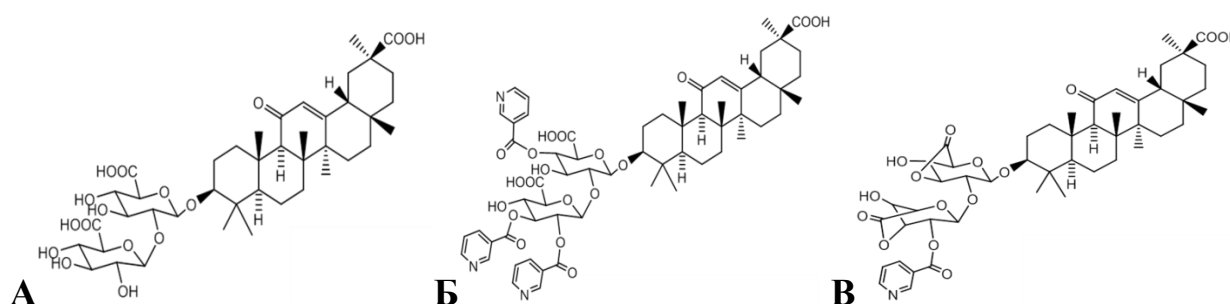


Рисунок 22 — Структурные формулы глицирризиновой кислоты (А), триникотината глицирризиновой кислоты (Б) и дегидратированной формы никотинатов глицирризиновой кислоты (В).

Необходимо отметить, что противовирусная активность сложных эфиров никотиновой и глицирризиновой кислот исследовалась ранее (Патент РФ 2304145, 2007; Патент РФ 2376312, 2009). В частности, было показано, что препараты, включающие разные соотношения ди- и триникотинатов глицирризиновой кислоты, подавляли репродукцию ВИЧ-1 в культуре клеток МТ-4 (Патент РФ 2304145, 2007; Патент РФ 2376312, 2009). В тоже время, ранее указанные производные глицирризиновой кислоты не изучались с использованием псевдовиральной системы, механизм действия указанных перспективных субстанций ранее исследован не был.

Исследование соединений на способность блокировать проникновение псевдовиралов в клетки-мишени Tzm-bl включало два этапа – 1) анализ на цитотоксичность, и 2) анализ на наличие ингибирующей активности (вирус нейтрализация).

Вначале была оценена токсичность полученных соединений и препаратов для клеточной линии Tzm-bl с использованием МТТ-теста и определена их 50% цитотоксическая концентрация (CC50). МТТ-тест показал, что для производных адамантана средняя величина CC50 составила 300 мкМ; для производных сложных эфиров (-)-борнеола диапазон CC50 составил 54,6–500 мкМ; для производных 10-камфоросульфокислоты диапазон CC50 составил 200-500 мкМ; для производных гидразона камфоры – 12,5-100 мкМ; для иминопроизводных камфоры величина CC50 составила >100; для производных фенхона – 31,25-1000 мкМ; для производных изоборниламина диапазон CC50 составил 100-342 мкМ; для производных норборниламина – 340-400 мкМ; для глицирризиновой кислоты и ее производных диапазон CC50 составил 250-1000 мкМ (таблица 7).

Таблица 7 – Цитотоксичность тестируемых соединений в отношении клеточной линии Tzm-bl

Номер соединения	СС50, мкМ	Номер соединения	СС50, мкМ
2-адамантановые амиды и амины			
1	>300	3	>300
2	300		
Сложноэфирные производные (-)-борнеола			
4	208,9	12	>500
5	54,6	13	489
6	245	14	>500
7	346	15	199,5
8	117,5	16	316
9	239	17	>500
10	>500	18	>100
11	77,6		
Производные 10-камфоросульфокислоты			
19	>500	22	>200
20	>500	23	>200
21	426,5	24	>200
Производные гидразона камфоры			
25	12,5	28	>100
26	>100	29	>100
27	>100	30	31,25
Иминопроизводные камфоры			
31	>100	32	>100
Производные фенхона			
33	250	36	250
34	>1000	37	31,25
35	500		
Производные изоборниламина			
38	>100	42	>100
39	>100	43	>100
40	>100	44	>342
41	>342	45	>336
Производные норборниламина			
46	>340	47	>400
Глицирризиновая кислота и её производные			
48	>1000	54	>950
49	>1000	55	524
50	>1000	56	>1000
51	>1000	57	490
52	250	58	>1000
53	645		

Затем для каждого соединения был выбран диапазон нетоксичных концентраций, в которых исследовалась противовирусная активность. Наличие ингибирующего действия проверяли по отношению к *env*-псевдовирусам ВИЧ-1, включенным как в международную референсную панель (подтип В), так и полученным в данной работе (подтип А6 и рекомбинантная форма CRF63_02A) (таблица 8). Анализ ингибирующей активности соединений проводили по методике, описанной в работе Legnani (Legnani et al., 2017). В качестве препарата сравнения был использован официально одобренный для антиретровирусной терапии ингибитор проникновения (антагонист ко-рецептора) – маравирик (MVC, Селзентри). Таблица 8 – Псевдовирусы, использованные для оценки ингибирующей активности производных терпеноидов

Псевдовиррус	Подтип	Ко-рецептор	Уровень чувствительности
SF162.LS	В	R5	1a
QH0692	В	R5	2
16RU28	CRF63_02A	R5	3
16RU54	A6	R5	2

Согласно результатам нейтрализующего анализа, ингибирующую активность по отношению к *env*-псевдовирусам проявило одно соединение, являющееся производным адамантана, и девять препаратов, представляющие собой триникотинаты глицирризиновой кислоты.

Среди производных каркасных соединений ингибирующие свойства проявило соединение под номером 2 (производное адамантана) (рисунок 23). Данное соединение представляет собой адамантилбромфениламин (бромантан, торговые наименования: «ладастен», «адамантилфениламин») — N-(2-адамантил)-N-(2-п-бромфенил)амин - лекарственное средство, психостимулятор, анксиолитик, иммуностропный препарат. Адамантилбромфениламин относится к группе так называемых актопротекторов — препаратов разных групп, повышающих защитные силы

организма (Oliynyk, Oh, 2012). Ранее противовирусные свойства данного соединения обнаружены не были.

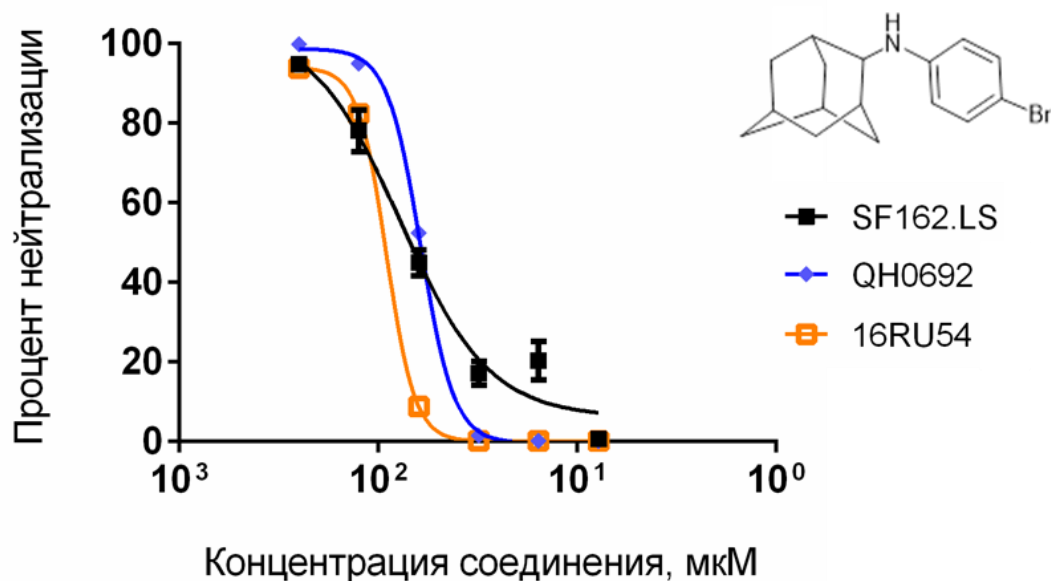


Рисунок 23 – Кривые нейтрализации адамантилбромфениламина в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

Данное соединение блокировало проникновение псевдовирусов подтипов В и А6 (таблица 9).

Таблица 9 – Ингибирующая активность адамантилбромфениламина в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1

Псевдовирус	Адамантилбромфениламин		MVC
	IC50, мкМ	SI (CC50/IC50)	IC50, мкМ
SF162.LS	69,5±6,92	4,3	0,002
ОН0692	59,8±2,92	5	0,002
16RU54	91,9±1,52	3,3	0,003

Среди девяти активных производных глицирризиновой кислоты, наиболее перспективным оказался препарат под номером 54, для которого значение IC50 составило <3.9 мкМ (для SF162.LS) и 6.91 мкМ (для 16RU28) (таблица 10). Данный препарат ингибировал проникновение псевдовирусов подтипа В и рекомбинантной формы CRF63_02A в клетку-мишень (рисунок 24).

Таблица 10 – Ингибирующая активность триникотинатов глицирризиновой кислоты в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1

Номер соединения	SF162.LS		OH0692		16RU28	
	IC ₅₀ , мкМ	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)	IC ₅₀ , мкМ	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)	IC ₅₀ , мкМ	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
48	н. а.	-	н. а.	-	н. а.	-
49	9,54	105	43,65	23	45,70	22
50	8,51	117	34,67	29	41,68	24
51	24,54	41	33,11	30	79,43	13
53	4,16	155	н. и.	-	12	54
54	<3.9	244	н. и.	-	6.91±0,23	138
55	12	44	н. и.	-	28.84	18
56	45,7	22	н. и.	-	64,56	15
57	123	4	н. и.	-	н. а.	-
58	20,41	49	н. и.	-	29,51	34
MVC	0,002	5000	0,002	5000	0,0016	6000

Н. и. – не исследовалась; н. а. – ингибирующая активность отсутствует.

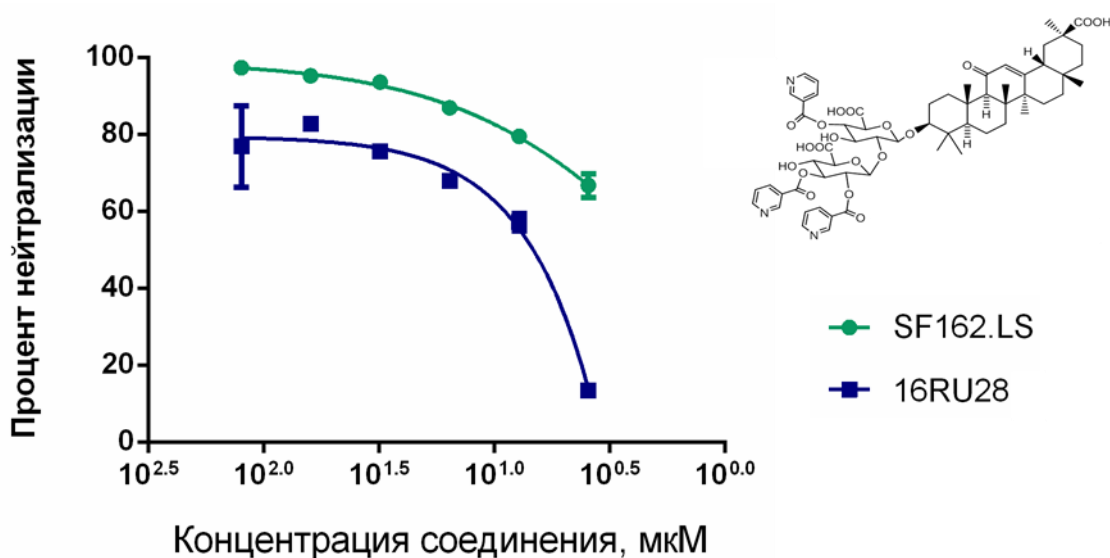


Рисунок 24 – Кривые нейтрализации препарата 54 в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

Интересно отметить, что глицирризиновая кислота (соединение 48) в анализе нейтрализации с *env*-псевдовирусами не проявила какой-либо ингибирующей активности в отношении псевдовирусов SF162.LS, OH0692, 16RU28, что дополнительно подтверждает результаты, полученные Sasaki с соавторами (Sasaki et al., 2002).

Далее, для того чтобы оценить, на какой из этапов вирусной инфекции воздействует наиболее активный препарат был проведен эксперимент по исследованию его ингибирующей активности в зависимости от времени добавления к инфицированным псевдовирусами клеткам (ТОА, time of addition assay). ТОА представляет собой ценный инструмент для определения механизма действия противовирусных препаратов. Четкое разграничение механизма действия в анализе ТОА требует синхронизированной инфекции в чувствительных клетках-мишенях, к которым добавляются тестируемые соединения в различные промежутки времени после инфицирования вирусом. Сравнение ингибирующей активности исследуемого соединения с охарактеризованными эталонными ингибиторами позволяет определить так называемый целевой этап жизненного цикла, на котором воздействует тестируемое соединение. Добавление ингибитора на целевом этапе цикла репликации или до него подавляет репликацию вируса; когда же ингибитор добавляется после этого целевого этапа, репликация вируса подавляться не будет (Van Loock et al., 2013). Так, в работе Wang с соавторами (Wang et al., 2018) приведены данные эксперимента по оценке временного интервала, необходимого для проявления ингибирующей активности различных АРП. Для наглядности приведен графический абстракт из данной статьи (рисунок 25). Как следует из приведенных данных, ингибиторы проникновения (маравирок и T20) проявляют максимальную ингибирующую активность в течение одного-двух часов после инфицирования клеток-мишеней вирусом; ингибитор обратной транскриптазы (азидотимидин) проявляет ингибирующую активность течение 6-9 часов после инфицирования вирусом; ингибитор интегразы (ралтегравир) проявляет ингибирующую активность течение 9 часов. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями (Lara et al., 2014; Donahue et al., 2010; Wang et al., 2018; Daelemans et al., 2011).

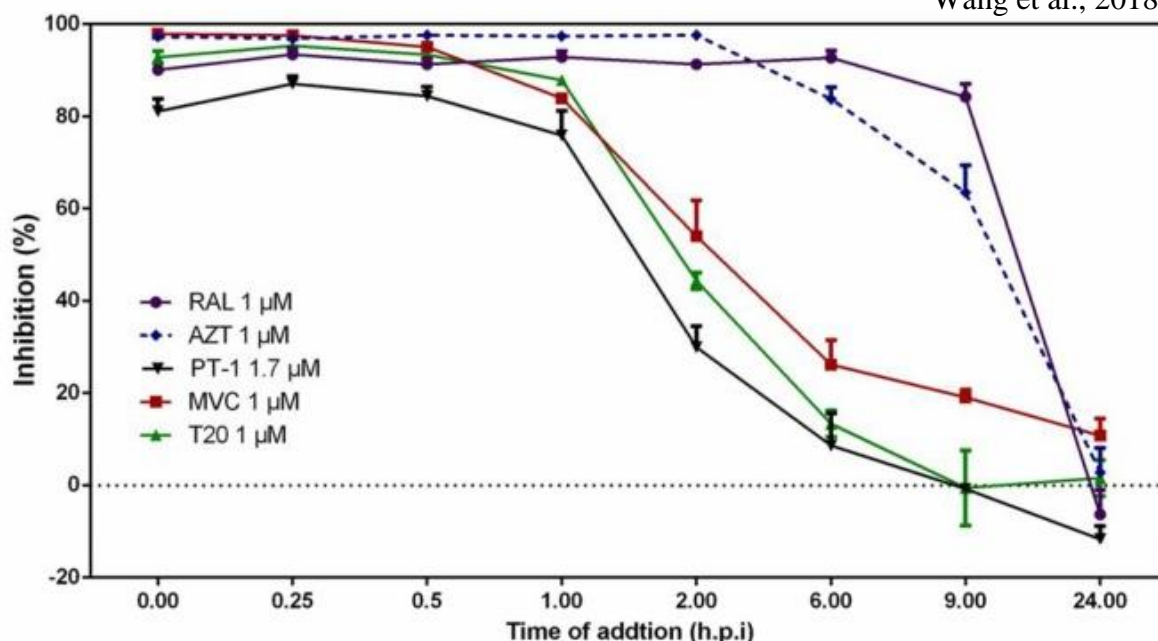


Рисунок 25 – Влияние различных режимов добавления препаратов на эффективность псевдовиральной инфекции с использованием клеточной линии TZM-bl. Клетки TZM-bl были инфицированы псевдовиром pREJO4541.67 ВИЧ-1 перед добавлением препаратов. Исследуемые препараты PT-1 (1,7 мкМ), маравирик (MVC, 1 мкМ), азидотимидин (AZT, 1 мкМ), T20 (1 мкМ) и ралтегравир (RAL, 1 мкМ) добавляли одновременно с инокуляцией вируса (0 ч) или в указанные моменты времени. Люциферазную активность определяли через 48 ч после заражения (Wang et al., 2018).

Эксперимент ТОА был проведен с использованием псевдовируса SF162.LS, а также референсного препарата с известным механизмом действия – маравирик (ингибитор проникновения). Тестируемый и контрольный препараты добавляли к клеткам TZM-bl в разные моменты времени – за 1 час до внесения вируса (-1 ч), одновременное внесение препаратов и псевдовируса к клеткам (0 ч) и добавление препаратов через 30 (0.5 ч), 60 (1 ч), 120 (2 ч), 180 (3 ч) и 240 минут (4 ч) после заражения клеток псевдовирусами соответственно (рисунок 26А).

Представленные на рисунке 26Б данные показывают, что препарат 54 демонстрирует профиль ингибирования, который находится в пределах временного интервала проникновения вируса, и соотносится с профилем ингибирования для MVC, что указывает на то, что данное соединение воздействует на этап проникновения вируса в клетку. Однако важно отметить,

что данный эксперимент позволяет только определить этап, на котором воздействует исследуемое соединение, но мишень и механизм действия детально установить невозможно. Поэтому требуется проведение дополнительных исследований.

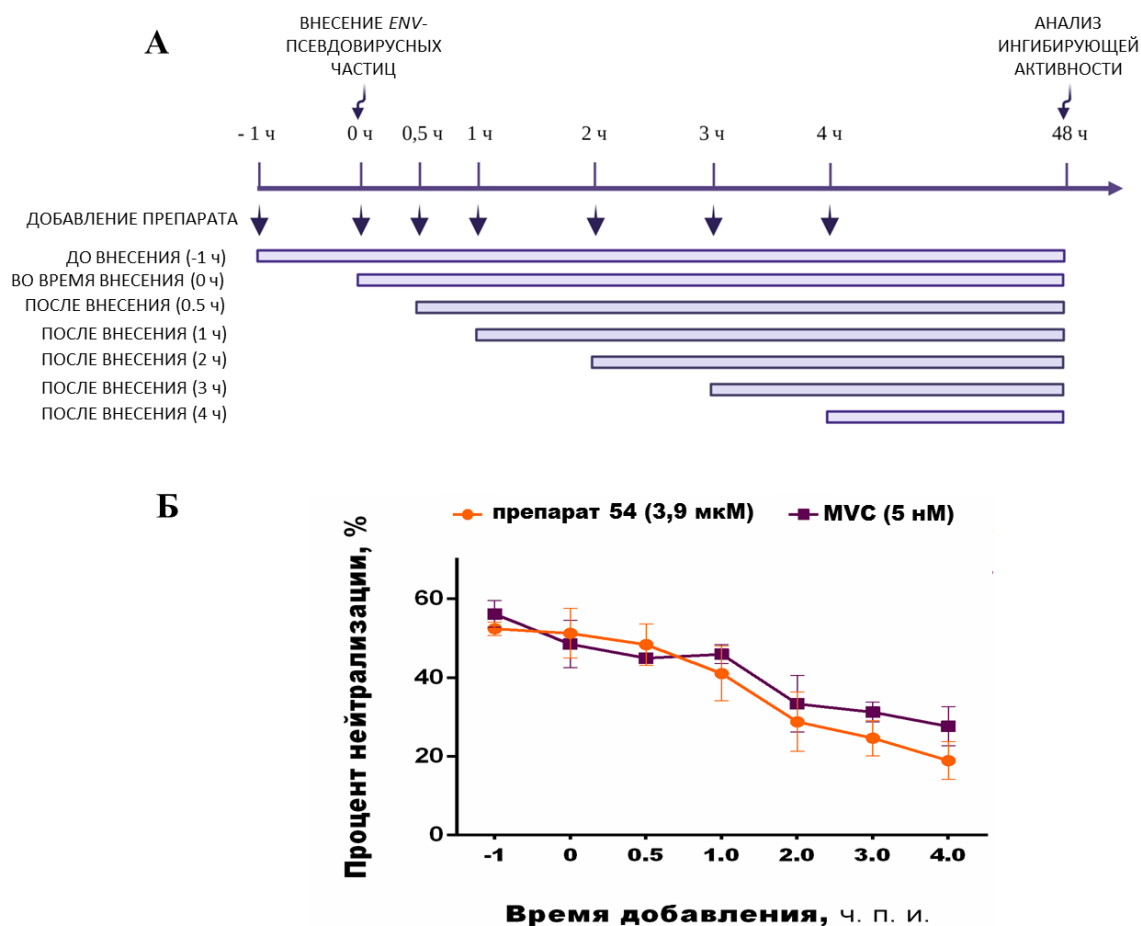


Рисунок 26 – А – схема добавления препаратов; Б - влияние различных режимов добавления тестируемого препарата 54 и контрольного препарата маравирок (MVC) на эффективность псевдовиральной инфекции. **-1** – инкубация клеток с препаратами в течение 1 часа, а затем добавление суспензии псевдовиральных частиц; **0** – одновременное добавление препаратов и суспензии псевдовиральных частиц к клеткам; **0.5, 1, 2, 3, 4 ч** – добавление препаратов к клеткам через 30, 60, 120, 180 и 240 минут после инфицирования клеток псевдовиральными частицами; ч. п. и. – часы после инфицирования клеток псевдовиральными частицами.

Таким, образом, *env*-псевдовиральная система позволила провести скрининг соединений, способных ингибировать проникновение вируса в клетку-мишень. Среди 63 протестированных соединений было выявлено 10 соединений, проявивших вируснейтрализующую активность как против

псевдовирусов из международной панели, так и региональных вариантов псевдовирусов CRF63_02A и A6. Среди активных соединений – одно соединение относится к производным адамантана (IC_{50} находится в диапазоне 59,8-91,9 мкМ) и 9 препаратов являются производными (триникотинатами) глицирризиновой кислоты (IC_{50} находится в диапазоне 3,9-123 мкМ). Дальнейшие исследования будут направлены на определение молекулярной мишени, на которую нацелен наиболее активный препарат, а полученные данные могут быть полезны для его проверки на натуральном вирусе ВИЧ-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, наиболее доступным средством борьбы с вирусом иммунодефицита человека является высоко активная антиретровирусная терапия, но, к сожалению, из-за таких биологических особенностей вируса, как интеграция провируса в геном человека, высокий уровень мутаций, приводящих к возникновению лекарственно-устойчивых штаммов и ускользанию вируса от иммунного ответа, и способность вируса инфицировать и поражать клетки адаптивной иммунной системы, существующие АРП не позволяют решить проблему полного искоренения ВИЧ в популяции человека. Вследствие этого существует острая необходимость в разработке новых препаратов против ВИЧ-1, включая ингибиторы проникновения, а также в создании эффективной профилактической вакцины. На данный момент значительная часть исследований в области вакцинации против ВИЧ-1 направлена на разработку иммуногенов и стратегий иммунизации, которые будут индуцировать протективный иммунный ответ, в том числе наработку антител, нейтрализующих широкий спектр первичных изолятов

Технология *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 представляет собой важный инструмент в исследованиях вакцинных и химиотерапевтических (ингибиторов проникновения) препаратов против ВИЧ-1. Анализ нейтрализующей активности с использованием псевдовирусов имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными реплицирующимися вирусными системами в культурах моноклеарных клеток периферической крови. Во-первых, псевдовирусы неспособны к репликации, и с ними можно безопасно обращаться за пределами дорогостоящей лаборатории с уровнем биобезопасности 3. А, во-вторых, анализы нейтрализации или ингибирования можно проводить на перевиваемой клеточной линии, тем самым снижая потребность в первичных донорских клетках. Вместе, эти элементы

обеспечивают точность, воспроизводимость и простоту стандартизации анализов на основе псевдовирусов (Li et al., 2005, Li et al., 2006).

На сегодняшний день сконструировано более 100 штаммов псевдотипированных вирусов ВИЧ-1, которые используются научными группами, занимающимися разработкой вакцин и ингибиторов проникновения вируса в клетку-мишень. Однако доступные в настоящее время псевдовирусы не являются репрезентативными для распространенных в РФ подтипов и рекомбинантных форм. Согласно недавнему отчету, в большинстве федеральных округов РФ доминирует подтип А6, при этом на территории Сибирского федерального округа развитие эпидемии определяет генетический вариант CRF63_02A ВИЧ-1. Поэтому необходимо проводить постоянную работу, направленную на получение новых вариантов псевдовирусов на основе актуальных циркулирующих штаммов ВИЧ-1.

В данном исследовании была проведена работа по получению псевдовирусов ВИЧ-1 на основе изолятов, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа, и их использованию для скрининга соединений, способных блокировать проникновение ВИЧ-1 в клетку-мишень.

В результате проделанной работы получено 13 *env*-псевдовирусов, которые относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A и подтипу А6 ВИЧ-1 и являются CCR5-тропными. Характеризация полученных псевдовирусов с помощью моноклональных широконейтрализующих антител показала, что большинство псевдовирусов оказались чувствительными к нейтрализации МАК VRC01, PGT126 и 10E8; проявили умеренную чувствительность к нейтрализации МАК PG9 и 4E10 и оказались устойчивыми к нейтрализации МАК 2G12, PG16 и 2F5.

Полученные *env*-псевдовирусы были использованы для скрининга библиотеки соединений с целью поиска таких веществ, которые были бы способны ингибировать слияние ВИЧ с клетками и предотвращать проникновение вируса. Было выявлено 10 соединений, способных блокировать проникновение псевдовирусов, как из международной панели,

так и региональных вариантов псевдовирюсов. Среди 10 активных соединений – одно соединение относится к производным адамантана (IC₅₀ находится в диапазоне 59,8-91,9 мкМ) и 9 соединений являются триникотинатами глицирризиновой кислоты (IC₅₀ находится в диапазоне 3,9-123 мкМ).

Полученные в данной работе псевдовирюсы могут быть использованы не только для поиска агентов, которые были бы способны ингибировать слияние ВИЧ с клетками, но и для оценки экспериментальных вакцин против ВИЧ-1.

ВЫВОДЫ

1) Сформирована и охарактеризована коллекция образцов сывороток крови ВИЧ-положительных доноров, собранных в период с 2016 по 2020 год и полученных из Центров по профилактике и борьбе со СПИД Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасия.

2) Проанализировано 59 последовательностей гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1. В результате проделанной работы установлено, что:

а) в Новосибирской и Кемеровской областях, Алтайском крае и Республике Хакасия продолжает доминировать рекомбинантная форма CRF63_02A, тогда как на территории Республики Алтай более 50% изученных циркулирующих штаммов ВИЧ-1 принадлежат к подтипу А6;

б) мутаций резистентности к ингибиторам протеазы в проанализированных нуклеотидных последовательностях не обнаружено; в последовательности гена обратной транскриптазы обнаружены мутации резистентности к группе нуклеозидных (M41L и K65R) и не-нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (K103N).

3) Получено 13 *env*-псевдовирусов, которые относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A и подтипу А6 ВИЧ-1 и являются CCR5-тропными. Исследован спектр чувствительности полученных псевдовирусов к нейтрализации моноклональными широконейтрализующими антителами. Установлено, что полученные псевдовирусы нейтрализуются моноклональными антителами VRC01, PGT126 и 10E8; умеренно нейтрализуются моноклональными антителами PG9 и 4E10 и устойчивы к нейтрализации моноклональными антителами 2G12, PG16 и 2F5.

4) С использованием полученных *env*-псевдовирусов проведено исследование противовирусной активности 58 производных терпеноидов, из

которых 10 препаратов продемонстрировали противовирусную активность. В результате проделанной работы установлено, что:

а) среди производных адамантана ингибирующими свойствами обладает N-(2-адамантил)-N-(2-п-бромфенил)амин, которое показало умеренную токсичность (300 мкМ) и противовирусную активность в отношении псевдовирусов, включенных в международную панель – SF162.LS (IC₅₀=69,5 мкМ и SI=4,3), ОН0692 (IC₅₀=59,8 мкМ и SI=5), и полученных в данной работе 16RU54 (IC₅₀=91,9 мкМ и SI=3,3);

б) среди препаратов производных глицирризиновой кислоты наиболее высоким ингибирующим потенциалом обладает препарат, который является триникотинатом глицирризиновой кислоты. Данный препарат показал низкую цитотоксичность (>950 мкМ) и хорошую противовирусную активность в отношении псевдовирусов SF162.LS (IC₅₀<3,9 мкМ и SI=244) и 16RU28 (IC₅₀=6,91 мкМ и SI=138);

в) оценка влияния ингибирующей активности препарата, который является триникотинатом глицирризиновой кислоты, на эффективность псевдовиральной инфекции в зависимости от времени его добавления к инфицированным псевдовirusами клеткам-мишеням, позволяет предположить, что данный препарат проявляет ингибирующие свойства на этапе проникновения вируса в клетку.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Агапкина Ю.Ю., Приказчикова Т.А., Смолов М.А., Готтих М.Б. Структура и функции интегразы ВИЧ // Успехи биологической химии. – 2005. – Т. 45. – С. 87-122.
2. Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Саухат С.Р., Шемшура А.Б., Колпаков Д.С., Кучеренко И.Б., Матузкова А.Н., Козырев О.А. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика распространения ВИЧ-инфекции на юге России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2013. – Т. 5. – № 4. – С. 73-81.
3. Гилязова А.В., Корнилаева Г.В., Хаметова К.М., Салихов Ш.И., Мавлянов С.М., Карамов Э.В. Сравнительный анализ активности растительных полифенолов по ингибированию ВИЧ-инфекции в Т-лимфобластоидной клеточной линии и мононуклеарах периферической крови // Иммунология. - 2011. - Т. 32. - № 1. - С. 4-6.
4. Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Ефимов Е.И. Анализ распространенности резистентных штаммов ВИЧ к антиретровирусным препаратам в Приволжском федеральном округе // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 6. – С. 39-41.
5. Зырянова Д.П., Астахова Е.М., Гашникова М.П., Исмаилова Т.Н., Бочаров Е.Ф., Чернов А.С., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. Выявление ВИЧ-1, резистентных к антиретровирусным препаратам, среди жителей Томской области с впервые диагностированной ВИЧ-инфекцией // Журнал инфектологии. – 2020. – Т. 12. - № 2. – С. 88-96.
6. Зырянова Д.П., Богачева Н.В., Тотменин А.В., Гашникова Н.М. Модели CRF63_02A6 ВИЧ-1 как инструмент для оценки эффективности разрабатываемых антиретровирусных препаратов // Инфекция и иммунитет. - 2020. - Т. 10. - № 4. - С. 769-774.
7. Информационный бюллетень по ВИЧ/СПИД [Электронный ресурс] Всемирная организация здравоохранения. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (дата обращения: 18.05.2021).

8. Казеннова Е.В., Антонова А.А., Ожмегова Е.Н., Демьяненко Э.Р., Минакова М.В., Белоусова О.В., Громов К.Б., Бобкова М.Р. Генетический анализ ВИЧ-1 в Алтайском крае: дальнейшее распространение варианта CRF63_02A1 по территории Западной Сибири // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2020. – Т. 12. - № 1. – С. 47-57.
9. Коалиция по готовности к лечению: Анализ закупок АРВ-препаратов в Российской Федерации в 2018 году [Электронный ресурс] // URL: <https://itpcru.org/2019/04/08/itogovyj-otchet-po-monitoringu-goszakupok-arv-preparatov-v-rf-v-2018-godu/> (дата обращения: 18.05.2021).
10. Кононова А.А., Чересиз С.В., Прокопьева Е.А., Алексеев А.Ю., Никитина Р.А., Шелемба А.А., Чепурнов А.А. Разработка системы для поиска ингибиторов вируса клещевого энцефалита // Современные проблемы науки и образования. - 2018. - № 6. - С. 1-9.
11. Конькова-Рейдман А.Б., Селютина Л.И., Кузюкин Н.Н., Рухтина О.Л., Буланьков Ю.И. ВИЧ-инфекция в Южно-Уральском регионе России на современном этапе: анализ эпидемиологической ситуации и новые подходы к оценке эффективности системы противодействия эпидемии // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 7. – № 4. – С. 77-82.
12. Котова В.О., Троценко О.Е., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, выделенных в субъектах Дальневосточного федерального округа // Вопросы вирусологии. – 2019. – Т. 64. - № 2. – С. 79-89.
13. Муранкина В.Р., Власов Е.В., Ивлев В.В., Тотменин А.В., Гашникова М.П., Мирджамалова Ф.О., и др. Данные текущего мониторинга эпидемии ВИЧ-инфекции в Новосибирской области // Молекулярная диагностика. – 2017. – С. 476-477.
14. Пат. 2199547 Российская Федерация, МПК C07J 63/00, A61K 31/7068. Амид глицирризиновой кислоты с 5-аминоурацилом, проявляющий анти-ВИЧ активность / Кондратенко Р. М., Балтина Л. А., Мустафина С. Р., Плясунова О.

- А., Покровский А. Г., Толстиков Г. А.; заявитель и патентообладатель Институт органической химии Уфимского научного центра РАН. – Оpubл. 24.02.03, 7 с.
15. Пат. 2304145 Российская Федерация, МПК C07J 53/00, C07J 63/00, A61P 31/18. Ди- и триникотинаты глицирризиновой кислоты и ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека / Толстиков Г. А., Балтина Л. А., Волчо К. П., Плясунова О. А., Покровский А. Г., Салахутдинов Н. Ф.; заявитель и патентообладатель – Закрытое акционерное общество «Сибфармакон». – Оpubл. 10.08.07, Бюл. № 22 – 11 с.
16. Пат. 2363703 Российская Федерация, МПК C07J 63/00. Способ получения пентаникотината глицирризиновой кислоты, являющегося ингибитором репродукции вируса иммунодефицита человека / Покровский А.Г., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью "Сибфармакон". – Оpubл. 10.08.09, 10 с.
17. Пат. 2376312 Российская Федерация, МПК C07J 53/00, C07J 63/00, A61P 31/18, A61K 31/70. Соли ди- и триникотинатов глицирризиновой кислоты и ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека на их основе / Салахутдинов Н. Ф., Толстиков Г. А., Покровский А. Г.; заявитель и патентообладатель – Закрытое акционерное общество «Сибфармакон». – Оpubл. 20.12.09, Бюл. №35 – 15 с.
18. Плясунова О.А., Егорычева И.П., Федюк Н.В., Покровский А.Г., Балтина Л.А., Муринов Ю.И., Толстиков Г.А. Изучение анти-ВИЧ-активности β -глицирризиновой кислоты // Вопросы вирусологии. – 1992. - № 5. – С. 235-237.
19. Рыжиков А.Б., Саркисян К.А., Карпенко Л.И., Пьянкова О.Г., Шаламова Л.А., Борисевич И.В., Воробьева М.С., Богрянцева М.П., Ильичев А.А., Монтефиори Д.С., и др. Апробация в доклинических испытаниях метода определения вируснейтрализующей активности вакцины-кандидата против ВИЧ-инфекции КомбиВИЧвак с использованием технологии псевдовирuсов ВИЧ-1 // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2012. - № 2 (63). - С. 70-76.

20. Щербакова Н.С. Конструирование В-клеточных иммуногенов против ВИЧ-1 и изучение их способности индуцировать нейтрализующие антитела: 03.01.03: дис. ... канд. биол. наук / Щербакова Надежда Сергеевна. – Кольцово, 2017. – 150 л.
21. Abel S., Back D.J., Vourvahis M. Maraviroc: pharmacokinetics and drug interactions // *Antiviral therapy*. – 2009. – V. 14. – № 5. – P. 607-618.
22. Adkins J.C., Faulds D. Amprenavir // *Drugs*. – 1998. – V. 55. – № 6. – P. 837-842.
23. Adkins J.C., Noble S. Efavirenz // *Drugs*. – 1998. – V. 56. – № 6. – P. 1055-1064.
24. Aiken C., Chen C.H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals // *Trends in molecular medicine*. – 2005. – V. 11. – № 1. – P. 31-36.
25. Ao Z., Patel A., Tran K., et al. Characterization of a trypsin-dependent avian influenza H5N1-pseudotyped HIV vector system for high throughput screening of inhibitory molecules // *Antiviral Research*. – 2008. – V. 79. – № 1. – P. 12-18.
26. Baalwa J., Wang S., Parrish N.F., Decker J.M., Keele B.F., Learn G.H., Yue L., Ruzagira E., Ssemwanga D., Kamali A., et al. Molecular identification, cloning and characterization of transmitted/founder HIV-1 subtype A, D and A/D infectious molecular clones // *Virology*. – 2013. – V. 436. – № 1. – P. 33-48.
27. Bang L.M., Scott L.J. Emtricitabine // *Drugs*. – 2003. – V. 63. – № 22. – P. 2413-2424.
28. Barouch D.H., Tomaka F.L., Wegmann F., Stieh D.J., Alter G., Robb M.L., et al. Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19) // *The Lancet*. – 2018. – V. 392. – P. 232-243.
29. Bekker L.G., Moodie Z., Grunenberg N., et al. Subtype C ALVAC-HIV and bivalent subtype C gp120/MF59 HIV-1 vaccine in low-risk, HIV-uninfected, South African adults: a phase 1/2 trial // *Lancet HIV*. – 2018. – V. 5. – № 7.
30. Blair H.A. Ibalizumab: A Review in Multidrug-Resistant HIV-1 Infection // *Drugs*. – 2020. – V. 80. – № 2. – P. 189-196.

31. Blish C.A., Jalalian-Lechak Z., Rainwater S., Nguyen M.A., Dogan O.C., Overbaugh J. Cross-subtype neutralization sensitivity despite monoclonal antibody resistance among early subtype A, C, and D envelope variants of human immunodeficiency virus type 1 // *Journal of Virology*. – 2009. – V. 83. – № 15. – P. 7783-7788.
32. Bricault C.A., Yusim K., Seaman M.S., Yoon H., Theiler J., Giorgi E.E., et al. HIV-1 neutralizing antibody signatures and application to epitope-targeted vaccine design // *Cell host & microbe*. – 2019. – V. 25. – № 1. – P. 59-72.
33. Brik A., Wong C.H. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2003. – V. 1. – № 1. – P. 5-14.
34. Burton D.R., Hangartner L. Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design // *Annual review of immunology*. – 2016. – V. 34. – P. 635-659.
35. Burton D.R., Mascola J.R. Antibody responses to envelope glycoproteins in HIV-1 infection // *Nature immunology*. – 2015. – V. 16. – № 6. – P. 571-576.
36. Caskey M. Broadly neutralizing antibodies for the treatment and prevention of HIV infection // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2020. – V. 15. – № 1. – P. 49-55.
37. Caskey M., Schoofs T., Gruell H., et al. Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals // *Nature Medicine*. – 2017. – V. 23. – № 2. – P. 185–191.
38. Chan D., Chutkowski C., Kim P. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV Type 1 gp41 is an attractive drug target // *PNAS*. – 1998. – V. 95. – № 26 – P. 15613-15617.
39. Chen Q., Tang K., Zhang X., Chen P., Guo Y. Establishment of pseudovirus infection mouse models for in vivo pharmacodynamics evaluation of filovirus entry inhibitors // *Acta pharmaceutica sinica B*. – 2018. – V. 8. – № 2. – P. 200-208.
40. Chenine A. L., Merbah M., Wieczorek L., Molnar S., Mann B., Lee J., O’Sullivan A.M., Bose M., Sanders-Buell E., Kijak G.H., et al. Neutralization sensitivity of a novel HIV-1 CRF01_AE panel of infectious molecular clones //

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2018. – V. 78. – № 3. – P. 348-355.

41. Chiu T.K., Davies D.R. Structure and function of HIV-1 integrase // Current topics in medicinal chemistry. – 2004. – V. 4. – № 9. – P. 965-977.

42. Cihlar T., Ray A.S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine // Antiviral research. – 2010. – V. 85. – № 1. – P. 39-58.

43. Cohen Y.Z., Caskey M. Broadly neutralizing antibodies for treatment and prevention of HIV-1 infection // Current Opinion in HIV and AIDS. – 2018. – V. 13. – № 4. – P. 366-373.

44. Colombier M.A., Molina J.M. Doravirine: a review // Current Opinion in HIV and AIDS. – 2018. – V. 13. – № 4. – P. 308-314.

45. Correia B.E., Ban Y.E.A., Holmes M.A., Xu H., Ellingson K., Kraft Z., et al. Computational design of epitope-scaffolds allows induction of antibodies specific for a poorly immunogenic HIV vaccine epitope // Structure. – 2010. – V. 18. – № 9. – P. 1116-1126.

46. Cottrell M.L., Hadzic T., Kashuba A.D.M. Clinical pharmacokinetic, pharmacodynamic and drug-interaction profile of the integrase inhibitor dolutegravir // Clinical pharmacokinetics. – 2013. – V. 52. – № 11. – P. 981-994.

47. Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. – P. 23213–23216.

48. Craigie R. The molecular biology of HIV integrase // Future Virology. – 2012. – V. 7. – № 7. – P. 679-686.

49. Croom K.F., Keam S.J. Tipranavir // Drugs. – 2005. – V. 65. – № 12. – P. 1669-1677.

50. Crowell T.A., Colby D.J., Pinyakorn S., et al. Safety and efficacy of VRC01 broadly neutralising antibodies in adults with acutely treated HIV (RV397): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // Lancet HIV. – 2019. – 6. – № 5. – P. 297-306.

51. Cunningham C.K., McFarland E.J., Morrison R.L., et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the broadly neutralizing HIV-1 monoclonal antibody VRC01 in HIV-exposed Newborn infants // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2019.
52. deCamp A., Hraber P., Bailer R.T., Seaman M.S., Ochsenbauer C., Kappes J., Gottardo R., Edlefsen P., Self S., Tang H., Greene K., et al. Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies // *Journal of Virology*. – 2014. – V. 88. – № 5. – P. 2489-2507.
53. Désiré N., Cerutti L., Le Hingrat Q., et al. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D sub-subtypes reclassification // *Retrovirology*. – 2018. – V. 15. – № 80. – P. 1-7.
54. Ding F., Layten M., Simmerling C. Solution structure of HIV-1 protease flaps probed by comparison of molecular dynamics simulation ensembles and EPR experiments // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – V. 130. – № 23. – P. 7184-7185.
55. Dorr P., Westby M., Dobbs S., et al. Maraviroc (UK-427857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – V. 49. – № 11. – P. 4721-4732.
56. Dragic T., Trkola A., Lin S.W., et al. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72. – № 1. – P. 279-285 48.
57. Dull T., Zufferey R., Kelly M., et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system // *Journal of Virology*. – 1998. – V. 72. – № 11. – P. 8463-8471.
58. Edmonds T.G., Ding H., Yuan X., Wei Q., Smith K.S., Conway J.A., Wieczorek L., Brown B., Polonis V., West J.T., et al. Replication competent molecular clones of HIV-1 expressing Renilla luciferase facilitate the analysis of antibody inhibition in PBMC // *Virology*. – 2010. – V. 408. – № 1. – P. 1-13.

59. El K.L., El H.K., Piquemal J-P., Femandjian S., Maroun R., Gresh N., Hobaika Z. Spectrometric and computational studies of the binding of HIV-1 integrase inhibitors to viral DNA extremities // *Physical Chemistry*. – 2019. – V. 1.
60. Engelman A., Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights // *Nature Reviews Microbiology*. – 2012. – V. 10. – № 4. – P. 279-290.
61. Eron Jr.J.J. HIV-1 Protease Inhibitors // *Clinical Infectious Diseases*. – 2000. – V. 30 (2). – P. S160-S170.
62. Farzan M., Mirzabekov T., Kolchinsky P., et al. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry // *Cell*. – 1999. – V. 96. – № 5. – P. 667-676.
63. Faulds D., Brogden R.N. Didanosine // *Drugs*. – 1992. – V. 44. – № 1. – P. 94-116.
64. Ferrara F., Molesti E., Bottcher-Friebertshauser E., et al. The human transmembrane protease serine 2 is necessary for the production of group 2 influenza A virus pseudotypes // *Journal of Molecular and Genetic Medicine*. – 2012. – V. 7. – P. 309-314.
65. Fessel W.J., Anderson B., Follansbee S.E., Winters M.A., Lewis S.T., Weinheimer S.P., et al. The efficacy of an anti-CD4 monoclonal antibody for HIV-1 treatment // *Antiviral research*. – 2011. – V. 92. – № 3. – P. 484-487.
66. Foley B.T., Korber B.T.M., Leitner T.K., Apetrei C., Hahn B., Mizrachi I., et al. HIV Sequence Compendium. – 2018.
67. Foster R.H., Faulds D. Abacavir // *Drugs*. – 1998. – V. 55. – № 5. – P. 729-736.
68. Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., et al. A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia // *AIDS research and human retroviruses*. – 2015. – V. 31. – № 4. – P. 456-460.
69. Gashnikova N.M., Zyryanova D.P., Astakhova E.M., et al. Predominance of CRF63_02A1 and multiple patterns of unique recombinant forms of CRF63_A1

among individuals with newly diagnosed HIV-1 infection in Kemerovo Oblast, Russia // *Archives of virology*. – 2017. – V. 162. – № 2. – P. 379-390.

70. Ghosh A.K., Dawson Z.L., Mitsuya H. Darunavir, a conceptually new HIV-1 protease inhibitor for the treatment of drug-resistant HIV // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2007. – V. 15. – № 24. – P. 7576-7580.

71. Ghosh A.K., Osswald H.L., Prato G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – V. 59. – № 11. – P. 5172-5208.

72. Goldsmith D.R., Perry C.M. Atazanavir // *Drugs*. – 2003. – V. 63. – № 16. – P. 1679-1693.

73. González N., Pérez-Olmeda M., Mateos E., Cascajero A., Alvarez A., Spijkers S., García-Pérez J., Sánchez-Palomino S., Ruiz-Mateos E., Leal M., et al. A sensitive phenotypic assay for the determination of human immunodeficiency virus type 1 tropism // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2010. – V. 65. – № 12. – P. 2493-2501.

74. Gray G.E., Bekker L.G., Laher F., Malahleha M., Allen M., Moodie Z., et al. Vaccine Efficacy of ALVAC-HIV and Bivalent Subtype C gp120–MF59 in Adults // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – V. 384. – № 12. – P. 1089-1100.

75. Gruell H., Klein F. Antibody-mediated prevention and treatment of HIV-1 infection // *Retrovirology*. – 2018. – V. 15. – № 1. – P. 1-11.

76. Guo Y., Rumschlag-Booms E., Wang J., et al. Analysis of hemagglutinin mediated entry tropism of H5N1 avian influenza // *Virology Journal*. – 2009. – V. 6. – № 1. – P. 1-13.

77. Hajimahdi Z., Zarghi A. Progress in HIV-1 Integrase Inhibitors: A Review of their Chemical Structure Diversity // *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. – 2016. – V. 15. – № 4. – P. 595-628.

78. Haynes B.F., Gilbert P.B., McElrath M.J. et al. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial // *The New England Journal of Medicine*. – 2013. – V. 366. – № 14. – P. 1275–1286.

79. Haynes B.F., Kelsoe G., Harrison S.C., Kepler T.B. B-cell-lineage immunogen design in vaccine development with HIV-1 as a case study // *Nature biotechnology*. – 2012. – V. 30. – № 5. – P. 423-433.
80. Hirabayashi K., Iwata S., Matsumoto H., Mori T., Shibata S., Baba M., et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in vitro // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. – 1991. – V. 39. – № 1. – P. 112-115.
81. Hornak V., Okur A., Rizzo R.C., Simmerling C. HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations // *PNAS*. – 2006. – V. 103. – № 4. – P. 915-920.
82. Hraber P., Rademeyer C., Williamson C., Seaman M.S., Gottardo R., Tang H., Greene K., Gao H., LaBranche C., Mascola J.R., et al. Panels of HIV-1 subtype C Env reference strains for standardized neutralization assessments // *Journal of Virology*. – 2017. – V. 91. – № 19.
83. Hsu A., Granneman G.R., Bertz R.J. Ritonavir // *Clinical pharmacokinetics*. – 1998. – V. 35. – № 4. – P. 275-291.
84. Hu J., Gao Q., He C., Huang A., Tang N., Wang K. Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 // *Genes & Diseases*. – 2020. – V. 7. – № 4. – P. 551-557.
85. Huang A.S., Palma E.L., Hewlett N., Roizman B. Pseudotype formation between enveloped RNA and DNA viruses // *Nature*. – 1974. – V. 252. – № 5485. – P. 743-745.
86. Huang C.C., Tang M., Zhang M.Y., et al. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core // *Science*. – 2005. – V. 310. – № 5750. – P. 1025-1028.
87. Huang J., Ofek G., Laub L., Louder M.K., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Imamichi H., Bailer R.T., Chakrabarti B., Sharma S.K., et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody // *Nature*. – 2012. – V. 491. – № 7424. – P. 406-412.

88. Huang L., Chen C. Understanding HIV-1 protease autoprocessing for novel therapeutic development // *Future medicinal chemistry*. – 2013. – V. 5. – № 11. – P. 1215-1229.
89. Huang Q.X., Chen H.F., Luo X.R., Zhang Y.X., Yao X., Zheng X. Structure and anti-HIV activity of betulinic acid analogues // *Current medical science*. – 2018. – V. 38. – № 3. – P. 387-397.
90. Hurst M., Faulds D. Lopinavir // *Drugs*. – 2000. – V. 60. – № 6. – P. 1371-1379.
91. Hyseni I., Molesti E., Benincasa L., Piu P., Casa E., Temperton N.J., Manenti A., Montomoli E. Characterisation of SARS-CoV-2 Lentiviral Pseudotypes and Correlation between Pseudotype-Based Neutralisation Assays and Live Virus-Based Micro Neutralisation Assays // *Viruses*. – 2020. – V. 12. – № 9.
92. Ilina T., LaBarge K., Sarafianos S.G., Ishima R., Parniak M. A. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity // *Biology*. – 2012. – V. 1. – № 3. – P. 521-541.
93. Irimia A., Serra A.M., Sarkar A., Jacak R., Kalyuzhnyi O., Sok D., et al. Lipid interactions and angle of approach to the HIV-1 viral membrane of broadly neutralizing antibody 10E8: Insights for vaccine and therapeutic design // *PLoS pathogens*. – 2017. – V. 13. – № 2.
94. Jackson J.B., Coombs R.W., Sannerud K., Rhame F.S., Balfour H.H. Rapid and sensitive viral culture method for human immunodeficiency virus type 1 // *Journal of clinical microbiology*. – 1988. – V. 26. – № 7. – P. 1416-1418.
95. Jacobo-Molina A., Ding J., Nanni R.G., Clark A.D.Jr, Lu X., Tantillo C., et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA // *PNAS*. – 1993. – V. 90. – P. 6320-6324.
96. Jacobson J.M., Kuritzkes D.R., Godofsky E., DeJesus E., Larson J.A., Weinheimer S.P., Lewis S.T. Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of multiple doses of ibalizumab (formerly TNX-355), an anti-CD4 monoclonal

antibody, in human immunodeficiency virus type 1-infected adults // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – V. 53. – № 2. – P. 450-457.

97. Jardine J., Julien J.P., Menis S., Ota T., Kalyuzhnyi O., McGuire A., et al. Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors // *Science*. – 2013. – V. 340. – № 6133. – P. 711-716.

98. Johnson M.C., Lyddon T.D., Suarez R., Salcedo B., LePique M., Graham M., Ricana C.L., Robinson C.A., Ritter D.G. Optimized pseudotyping conditions for the SARS-COV-2 spike glycoprotein // *bioRxiv*. – 2020. – P. 1-19.

99. Johnston E., Dupnik K.M., Gonzales M.J., Winters M.A., Rhee S.Y., Imamichi T., Shafer R.W. Panel of prototypical infectious molecular HIV-1 clones containing multiple nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. // *AIDS*. – 2005. – V. 19. – № 7. – P. 731-733.

100. Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A., et al. A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein // *Journal of Virological Methods*. – 2009. – V. 160. – № 1-2. – P. 7-13.

101. Kalapila A.G., Marrazzo J. Antiretroviral therapy for prevention of human immunodeficiency virus infection // *Medical Clinics*. – 2016. – V. 100. – № 4. – P. 927-950.

102. Kazakova O.B., Smirnova I.E., Baltina L.A., Boreko E.I., Savinova O.V., Pokrovskii A.G. Antiviral activity of acyl derivatives of betulin and betulinic and dihydroquinopimaric acids // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2018. – V. 44. – № 6. – P. 740-744.

103. Kearney B.P., Flaherty J.F., Shah J. Tenofovir disoproxil fumarate // *Clinical pharmacokinetics*. – 2004. – V. 43. – № 9. – P. 595-612.

104. Kelsoe G., Haynes B.F. Host controls of HIV broadly neutralizing antibody development // *Immunological reviews*. – 2017. – V. 275. – № 1. – P. 79-88.

105. Kim M., Song L., Moon J., Sun Z.Y.J., Bershteyn A., Hanson M., et al. Immunogenicity of membrane-bound HIV-1 gp41 membrane-proximal external region (MPER) segments is dominated by residue accessibility and modulated by

stereochemistry // *Journal of Biological Chemistry*. – V. 288. – № 44. – P. 31888-31901.

106. Kipp D.R., Hirschi J.S., Wakata A., Goldstein H., Schramm V.L. Transition states of native and drug-resistant HIV-1 protease are the same // *PNAS*. – 2012. – V. 109. – № 17. – P. 6543-6548.

107. Klein J.S., Bjorkman P.J. Few and far between: how HIV may be evading antibody avidity // *PLoS Pathogen*. – 2010. – V. 6.

108. Kliger Y., Shai Y. Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – V. 295. – № 2. – P. 163-168.

109. Knechten H., Lippok B., Knickmann M., Braun P. Switch from indinavir (IDV) to nelfinavir (NFV) in patients on antiviral therapy with stavudin (d4T) and lamivudin (3TC) // *AIDS*. – 1998. – V. 12.

110. Kohlstaedt L.A., Wang J., Friedman J.M., Rice P.A., Steitz T.A. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor // *Science*. – 1992. – V. 256. – P. 1783-1790.

111. Kong R., Xu K., Zhou T., Acharya P., Lemmin T., Liu K., Ozorowski G., Soto C., Taft J., Bailer R., et al. Fusion peptide of HIV-1 as a site of vulnerability to neutralizing antibody // *Science*. – 2016. – V. 352. – № 6287. – P. 828-833.

112. Kononova A.A., Sokolova A.S., Cheresiz S.V., Yarovaya O.I., Nikitina R.A., Chepurnov A.A., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. N-Heterocyclic borneol derivatives as inhibitors of Marburg virus glycoprotein-mediated VSIV pseudotype entry // *MedChemComm*. – 2017. – V. 8. – № 12. – P. 2233-2237.

113. Kostaki E.G., Karamitros T., Bobkova M., et al. Spatiotemporal characteristics of the HIV-1 CRF02_AG/CRF63_02A1 epidemic in Russia and central Asia // *AIDS research and human retroviruses*. – 2018. – V. 34. – № 5.

114. Kovaleva K.S., Yarovaya O.I., Gatilov Y.V., Slita A.V., Esaulkova Y.L., Zarubaev V.V., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Salakhutdinov N.F. Synthesis and Antiviral Activity of N-Heterocyclic Hydrazine

Derivatives of Camphor and Fenchone // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2021. – P. 1-7.

115. Kuritzkes D.R. HIV-1 entry inhibitors: An overview // Current Opinion in HIV and AIDS. – 2009. – V. 4. – № 2. – C. 82-87.

116. Ladinsky M.S., Gnanapragasam P.N., Yang Z., West A.P., Kay M.S., Bjorkman P.J. Electron tomography visualization of HIV-1 fusion with target cells using fusion inhibitors to trap the pre-hairpin intermediate // Elife. – 2020. – V. 9.

117. Lagane B., Garcia-Perez J., Kellenberger E. Modeling the allosteric modulation of CCR5 function by Maraviroc // Drug Discovery Today: Technologies. – 2013. – V. 10. – № 2. – P. 297-305.

118. Lai W., Huang L., Ho P., Li Z., Montefiori D., Chen C. H. Betulinic acid derivatives that target gp120 and inhibit multiple genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2008. – V. 52. – № 1. – P. 128-136.

119. Lalezari J.P., Henry K., O'Hearn M., Montaner J.S., Piliero P.J., Trottier B., et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America // New England Journal of Medicine. – 2003. – V. 348. – № 22. – P. 2175-2185.

120. Lee B.H., Yoshimatsu K., Araki K., Okumura M., Nakamura I., Arikawa J. A pseudotype vesicular stomatitis virus containing Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 as an alternative to hantavirus vaccine in mice // Vaccine. – 2006. – V. 24. – № 15. – P. 2928-2934.

121. Legnani L., Colombo D., Venuti A., Pastori C., Lopalco L., Toma L., et al. Diazabicyclo analogues of maraviroc: synthesis, modeling, NMR studies and antiviral activity // MedChemComm. – 2017. – V 8. – № 2. – P. 422-433.

122. Li M., Gao F., Mascola J.R., Stamatatos L., Polonis V.R., Koutsoukos M., et al. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies // Journal of Virology. – 2005. – V. 79. – № 16. – P. 10108-10125.

123. Li Q., Liu Q., Huang W., Li X., Wang, Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses // *Reviews in medical virology*. – 2018. – V. 28. – № 1. – P. 1-10.
124. Liu H., Su X., Si L., Lu L., Jiang, S. The development of HIV vaccines targeting gp41 membrane-proximal external region (MPER): challenges and prospects // *Protein & cell*. – 2018. – V. 9. – № 7. – P. 596-615.
125. Liu Y., Cao W., Sun M., Li T. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities // *Emerging microbes & infections*. – 2020. – V. 9. – № 1. – P. 194-206.
126. Lobritz M.A., Ratcliff A.N., Arts E.J. HIV-1 entry, inhibitors, and resistance // *Viruses*. – 2010. – V. 2. – № 5. – P. 1069-1105.
127. Lv Z., Chu Y., Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity // *HIV/AIDS*. – 2015. – V. 7. – P. 95-104.
128. Mahomed S., Garrett N., Baxter C., Abdool Karim Q., Abdool Karim S.S. Clinical trials of broadly neutralizing monoclonal antibodies for human immunodeficiency virus prevention: a review // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – V. 223. – № 3. – P. 370-380.
129. Mann A.M., Rusert P., Berlinger L., Kuster H., Günthard H.F., Trkola A. HIV sensitivity to neutralization is determined by target and virus producer cell properties // *AIDS*. – 2009. – V. 23. – № 13. – P. 1659-1667.
130. Markham A. Ibalizumab: first global approval // *Drugs*. – 2018. – V. 78. – № 7. – P. 781-785.
131. Mascola J.R., D'Souza P., Gilbert P., Hahn B.H., Haigwood N.L., Morris L., Petropoulos C., Polonis V., Sarzotti M., Montefiori D. Recommendations for the Design and Use of Standard Virus Panels To Assess Neutralizing Antibody Responses Elicited by Candidate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccines // *Journal of Virology*. – 2005. – V. 79. – №. 16. – P. 10103–10107.
132. Mascola J.R., Montefiori D.C. The role of antibodies in HIV vaccines // *Annual review of immunology*. – 2010. – V. 28. – P. 413-444.

133. Mascola J.R., Snyder S.W., Weislow O.S., Belay S.M., Belshe R.B., Schwartz D.H., Clements M.L., Dolin R., Graham B.S., Gorse G.J., et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 // *Journal of Infectious Diseases*. – 1996. – V. 173. – № 2. – P. 340-348.
134. Matsuura Y., Tani H., Suzuki K., et al. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins // *Virology*. – 2001. – V. 286. – № 2. – P. 263-275.
135. Mavian C., Coman R.M., Zhang X., Pomeroy S., Ostrov D.A., Dunn B.M., Sleasman J.W., Goodenow M.M. Molecular docking-based screening for novel inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1 protease that effectively reduce the viral replication in human cells // *bioRxiv*. 2020.
136. Max B. Update on HIV integrase inhibitors for the treatment of HIV-1 infection // *Future Virology*. – 2019. – V. 14. – № 10. – P. 693-709.
137. Mayer K.H., Seaton K.E., Huang Y., et al. Safety, pharmacokinetics, and immunological activities of multiple intravenous or subcutaneous doses of an anti-HIV monoclonal antibody, VRC01, administered to HIV uninfected adults: results of a phase 1 randomized trial // *PLOS Medicine*. – 2017. – V. 14.
138. Medina M.F., Kobinger G.P., Rux J., et al. Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung // *Molecular Therapy*. – 2003. – V. 8. – № 5. – P. 777-789.
139. Mirochnick M., Clarke D.F., Dorenbaum A. Nevirapine // *Clinical pharmacokinetics*. – 2000. – V. 39. – № 4. – P. 281-293.
140. Moeschler S., Locher S., Conzelmann K.K., Krämer B., Zimmer G. Quantification of lyssavirus-neutralizing antibodies using vesicular stomatitis virus pseudotype particles // *Viruses*. – 2016. – V. 8. – № 9. – P. 1-14.
141. Mohan G.S., Ye L., Li W., Monteiro A., Lin X., Sapkota B., Pollack B.P., Compans R.W., Yang C. Less is more: Ebola virus surface glycoprotein expression levels regulate virus production and infectivity // *Journal of Virology*. – 2015. – V. 89. – № 2. – P. 1205-1217.

142. Mohsin N.U.A., Ahmed M., Irfan M. Zidovudine: structural modifications and their impact on biological activities and pharmacokinetic properties // *Journal of the Chilean Chemical Society*. – 2019. – V. 64. – № 3. – P. 4523-4530.
143. Molina J.M., Cahn P., Grinsztejn B., Lazzarin A., Mills A., Saag M., et al. Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): a phase 3 randomised double-blind active-controlled trial // *The Lancet*. – 2011. – V. 378. – № 9787. – P. 238-246.
144. Molinos-Albert L.M., Clotet B., Blanco J., Carrillo J. Immunologic insights on the membrane proximal external region: a major human immunodeficiency virus type-1 vaccine target // *Frontiers in immunology*. – 2017. – V. 8. – P. 1-12.
145. Montefiori D.C. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay // *Humana Press*. – 2009. – P. 395-405.
146. Montefiori D.C., Roederer M., Morris L., Seaman M.S. Neutralization tiers of HIV-1 // *Current Opinion in HIV and AIDS*. – 2017. – V. 13. – № 2. – P. 1-9.
147. Moore P.L., Crooks E.T., Porter L., Zhu P., Cayanan C.S., Grise H., et al. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1 // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – P. 2515-2528.
148. Mouscadet J.F., Delelis O., Marcelin A.G., Tchertanov L. Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: a structural perspective // *Drug Resistance Updates*. – 2010. – V. 13. – № 4-5. – P. 139-150.
149. Nadai Y., Eyzaguirre L.M., Constantine N.T., Sill A.M., Cleghorn F. Protocol for Nearly Full-Length Sequencing of HIV-1 RNA from // *PLoS ONE*. – 2008. – № 9. – P. 1-6.
150. Namasivayam V., Vanangamudi M., Kramer V.G., Kurup S., Zhan P., Liu X., et al. The Journey of HIV-1 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) from Lab to Clinic // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – V. 62. – № 10. – P. 4851-4883.
151. Nie J., Liu L., Wang Q., Chen R., Ning T., Liu Q., Huang W., Wang Y. Nipah pseudovirus system enables evaluation of vaccines in vitro and in vivo using non-

BSL-4 facilities // *Emerging microbes & infections*. – 2019. – V. 8. – № 1. – P. 272-281.

152. Nie J., Wu X., Ma J., Cao S., Huang W., Liu Q., Li X., Li Y., Wang Y. Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 1-12.

153. Nie J., Zhang C., Liu W., Wu X., Li F., Wang, S., Liang F., Song A., Wang Y. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 CRF01_AE env molecular clones from infections in China // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2010. – V. 53. – № 4. – P. 440-450.

154. Noble S., Faulds D. Saquinavir // *Drugs*. – 1996. – V. 52. – № 1. – P. 93-112.

155. Ochsenbauer C., Edmonds T.G., Ding H., Keele B.F., Decker J., Salazar M.G., Salazar-Gonzalez J.F., Shattock R., Haynes B.F., Shaw G.M., et al. Generation of transmitted/founder HIV-1 infectious molecular clones and characterization of their replication capacity in CD4 T lymphocytes and monocyte-derived macrophages // *Journal of Virology*. – 2012. – V. 86. – № 5. – P. 2715-2728.

156. Ogino M., Ebihara H., Lee B.H., et al. Use of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing Hantaan or Seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2003. – V. 10. – № 1. – P. 154-160.

157. Oliynyk S., Oh S. The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance // *Biomolecules & therapeutics*. – 2012. – V. 20. – № 5. – C. 446–456.

158. Ou L., Kong W.P., Chuang G.Y., Ghosh M., Gulla K., O'Dell S., et al. Preclinical development of a fusion peptide conjugate as an HIV Vaccine immunogen // *Scientific reports*. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 1-13.

159. Pace C.S., Fordyce M.W., Franco D., Kao C.Y., Seaman M.S., Ho D.D. Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits breadth and potency against HIV-1, with natural resistance mediated by the loss of a V5 glycan in envelope // *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. – 2013. – V. 62. – № 1. – P. 1-9.

160. Peeters M., Jung M., Ayouba A. The origin and molecular epidemiology of HIV // Expert review of anti-infective therapy. – 2013. – V. 11. – № 9. – P. 885-896.
161. Pegu A., Hessel A.J., Mascola J.R., Haigwood N.L. Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention // Immunological Reviews. – 2017. V. 275. – P. 296–312.
162. Perry C.M., Benfield P. Nelfinavir // Drugs. – 1997. – V. 54. – № 1. – P. 81-87.
163. Perry C.M., Faulds D. Lamivudine // Drugs. – 1997. – V. 53. – № 4. – P. 657-680.
164. Phanuphak N., Gulick R.M. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care // Current Opinion in HIV and AIDS. – 2020. – V. 15. – № 1. – P. 4-12.
165. Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., Chesebro B., Kabat D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1 // Journal of Virology. – 1998. – V. 72. – P. 2855-2864.
166. Plosker G.L., Noble S. Indinavir // Drugs. – 1999. – V. 58. – № 6. – P. 1165-1203.
167. Pollara J., Bonsignori M., Anthony Moody M., Pazgier M., Haynes B., Ferrari G. Epitope specificity of human immunodeficiency virus-1 antibody dependent cellular cytotoxicity [ADCC] responses // Current HIV research. – 2013. – V. 11. – № 5. – P. 378-387.
168. Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E., & Schiffer C.A. Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes // Structure. – 2012. – V. 10. – № 3. – P. 369-381.
169. Princen K., Hatse S., Vermeire K., De Clercq E., Schols D. Establishment of a novel CCR5 and CXCR4 expressing CD4+ cell line which is highly sensitive to HIV and suitable for high-throughput evaluation of CCR5 and CXCR4 antagonists // Retrovirology. – 2004. – V. 1. – № 1. – P. 1-13.

170. Pu J., Wang Q., Xu W., Lu L., Jiang S. Development of Protein-and Peptide-Based HIV Entry Inhibitors Targeting gp120 or gp41 // *Viruses*. – 2019. – V. 11. – № 8.
171. Pugach P., Marozsan A.J., Ketas T.J., Landes E.L., Moore J.P., Kuhmann S.E. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry // *Virology*. – 2007. – V. 361. – № 1. – P. 212-228.
172. Qian K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy // *Medicinal research reviews*. – 2009. – V. 29. – № 2. – P. 369-393.
173. Quashie P.K., Han Y.S., Hassounah S., Mesplède T., Wainberg M.A. Structural Studies of the HIV-1 Integrase Protein: Compound Screening and Characterization of a DNA-Binding Inhibitor // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 6.
174. Quinn K., Brindley M.A., Weller M.L., et al. Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors // *Journal of Virology*. – 2009. – V. 83. – № 19. – P. 10176-10186.
175. Rai M.A., Pannek S., Fichtenbaum C.J. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection // *Expert Opinion on Emerging Drugs*. – 2018. – V. 23. – № 2. – P. 149-157.
176. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S., et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand // *The New England Journal of Medicine*. – 2009. – V. 361. – № 23. – P. 2209–2220.
177. Reuman E.C., Bachmann M.H., Varghese V., Fessel W.J., Shafer R.W. Panel of prototypical raltegravir-resistant infectious molecular clones in a novel integrase-deleted cloning vector // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – № 2. – P. 934-936.
178. Revilla A., Delgado E., Christian E.C., Dalrymple J., Vega Y., Carrera C., González-Galeano M., Ocampo A., de Castro R., et al. Construction and phenotypic characterization of HIV type 1 functional envelope clones of subtypes G and F // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2011. – V. 27. – № 8. – P. 889–901.

179. Rizza S.A., Bhatia R., Zeuli J., Temesgen Z. Ibalizumab for the treatment of multidrug-resistant HIV-1 infection // *Drugs of today*. – 2019. – V. 55. – № 1. – P. 25-34.
180. Robertson D.L., Anderson J.P., Bradac J.A., Carr J.K., Foley B., Funkhouser R.K., et al. HIV-1 nomenclature proposal // *Science*. – 2000. V. 288. – № 5463. – P. 55-65.
181. Rossi E., Meuser M.E., Cunanan C.J., Cocklin S. Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein // *Life*. – 2021. – V. 11. – № 2. – P. 1-25.
182. Rudometov A.P., Chikhaev A.N., Rudometova N.B., Antonets D.V., Lomzov A.A., Kaplina O.N., et al. Artificial anti-HIV-1 immunogen comprising epitopes of broadly neutralizing antibodies 2F5, 10E8, and a peptide mimic of VRC01 discontinuous epitope // *Vaccines*. – 2019. – V. 7. – № 3.
183. Rumyantseva O.A., Olkhovskiy I.A., Malysheva M.A., et al. Epidemiological networks and drug resistance of HIV type 1 in Krasnoyarsk region, Russia // *AIDS research and human retroviruses*. – 2009. – V. 25. – № 9. – P. 931-936.
184. Sahay B., Nguyen C. Q., Yamamoto J. K. Conserved HIV epitopes for an effective HIV vaccine // *Journal of clinical & cellular immunology*. – 2017. – V. 8. – № 4.
185. Sakuma T., De Ravin S.S., Tonne J.M., Thatava T., Ohmine S., Takeuchi Y., et al. Characterization of retroviral and lentiviral vectors pseudotyped with xenotropic murine leukemia virus-related virus envelope glycoprotein // *Human gene therapy*. – 2010. – V. 21. – № 12. – P. 1665-1673.
186. Sanders R.W., Derking R., Cupo A., Julien J.P., Yasmeeen A., de Val N., et al. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP. 664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies // *PLoS pathogen*. – 2013. – V. 9. – № 9.
187. Sanders R.W., Moore J.P. Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design // *Immunological reviews*. – 2017. – V. 275. – № 1. – P. 161-182.
188. Sandrin V., Boson B., Salmon P., et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and

augmented transduction of primary lymphocytes and CD34⁺ cells derived from human and nonhuman primates // *Blood*. – 2002. – V. 100. – № 3. – P. 823-832.

189. Sandrin V., Cosset F.L. Intracellular versus cell surface assembly of retroviral pseudotypes is determined by the cellular localization of the viral glycoprotein, its capacity to interact with Gag, and the expression of the Nef protein // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – № 1. – P. 528-542.

190. Santoro M.M., Perno C.F. HIV-1 genetic variability and clinical implications // *International Scholarly Research Notices*. – 2013. – P. 1-20.

191. Sarafianos S.G., Marchand B., Das K., Himmel D.M., Parniak M.A., Hughes S.H., Arnold E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition // *Journal of molecular biology*. – 2009. – V. 385. – № 3. – P. 693-713.

192. Sasaki H., Takei M., Kobayashi M., Pollard R.B., Suzuki F. Effect of glycyrrhizin, an active component of licorice roots, on HIV replication in cultures of peripheral blood mononuclear cells from HIV-seropositive patients // *Pathobiology*. – 2002. – V. 70. – № 4. – P. 229-236.

193. Sauter D., Unterweger D., Vogl M., Usmani S.M., Heigele A., Kluge S.F., et al. Human tetherin exerts strong selection pressure on the HIV-1 group N Vpu protein // *PLoS Pathogen*. – 2012. – V. 8. – № 12.

194. Scheid J.F., Horwitz J.A., Bar-On Y., et al. HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption // *Nature*. – 2016. – V. 535. – P. 556-560.

195. Schnell M.J., Buonocore L., Kretzschmar E., Johnson E., Rose J.K. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles // *PNAS*. – 1996. – V. 93. – № 21. – P. 11359-11365.

196. Schöller-Gyüre M., Kakuda T.N., Raoof A., De Smedt G., Hoetelmans R. M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of etravirine // *Clinical pharmacokinetics*. – 2009. – V. 48. – № 9. – P. 561-574.

197. Scholz C., Schaarschmidt P., Engel A.M., Andres H., Schmitt U., Faatz E., Balbach J., Schmid F.X. Functional solubilization of aggregation-prone HIV envelope proteins by covalent fusion with chaperone modules // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – V. 345. – № 5. – P. 1229–1241.
198. Scott L.J., Perry C.M. Delavirdine // *Drugs*. – 2000. – V. 60. – № 6. – P. 1411–1444.
199. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance // *AIDS*. – 2007. – V. 21. – № 2. – P. 215–223.
200. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 // *PNAS*. – 2020. – V. 117. – № 21. – P. 11727–11734.
201. Sharp P.M., Hahn B.H. Origins of HIV and the AIDS pandemic // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2011. – V. 1. – № 1.
202. Shcherbakova N.S., Shalamova L.A., Delgado E., Fernández-García A., Vega Y., Karpenko L.I., et al. Molecular epidemiology, phylogeny, and phylodynamics of CRF63_02A1, a recently originated HIV-1 circulating recombinant form spreading in Siberia // *AIDS research and human retroviruses*. – 2014. – V. 30. – № 9. – P. 912–919.
203. Sokolova A.S., Baranova D.V., Yarovaya O.I., Baev D.S., Polezhaeva O.A., Zybkina A.V., et al. Synthesis of (1 S)-(+)-camphor-10-sulfonic acid derivatives and investigations in vitro and in silico of their antiviral activity as the inhibitors of filovirus infections // *Russian Chemical Bulletin*. – 2019. – V. 68. – № 5. – P. 1041–1046.
204. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Salakhutdinov N.F. Synthesis and antiviral activity of camphor-based 1, 3-thiazolidin-4-one and thiazole derivatives as Orthopoxvirus-reproduction inhibitors // *MedChemComm*. – 2018. – V. 9. – № 10. – P. 1746–1753.
205. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Salakhutdinov N.F. Discovery of a new class of inhibitors of Vaccinia virus based on (-)-borneol

from *Abies sibirica* and (+)-camphor // *Chemistry & Biodiversity*. – 2018. – V. 15. – № 9.

206. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Semenova M.D., Shtro A.A., Orshanskaya I.R., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis and in vitro study of novel borneol derivatives as potent inhibitors of the influenza A virus // *MedChemComm*. – 2017. – V. 8. – № 5. – P. 960-963.

207. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Baev D.S., Shernyukov A.V., Shtro A.A., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Aliphatic and alicyclic camphor imines as effective inhibitors of influenza virus H1N1 European // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 127. – P. 661-670.

208. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Gatilov Yu.V., Razumova Yu.V., Zarubaev V.V., Tretiak T.S., Pokrovsky A.G., Kiselev O.I., Salakhutdinov N.F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2015. – V. 105. – P. 263-273.

209. Stefic K., Bouvin-Pley M., Essat A., Videloup C., Moreau A., Goujard C., Chaix M.L., Braibant M., Meyer L., Barin F., et al. Sensitivity to broadly neutralizing antibodies of recently transmitted HIV-1 clade CRF02_AG viruses with a focus on evolution over time // *Journal of Virology*. – 2019. – V. 93. – № 2. – P. 1-17.

210. Stillman E.A., Rose J.K., Whitt M.A. Replication and amplification of novel vesicular stomatitis virus minigenomes encoding viral structural proteins // *Journal of Virology*. – 1995. – V. 69. – № 5. – P. 2946-2953.

211. Sun L., Zhang X., Xu S., Huang T., Song S., Cherukupalli S., et al. An Insight on Medicinal Aspects of Novel HIV-1 Capsid Protein Inhibitors // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 227. – P. 1-10.

212. Sun Z., Zhu Y., Wang Q., Ye L., Dai Y., Su S., et al. An immunogen containing four tandem 10E8 epitope repeats with exposed key residues induces antibodies that neutralize HIV-1 and activates an ADCC reporter gene // *Emerging microbes & infections*. – 2016. – V. 5. – № 1. – P. 1-12.

213. Sundquist W.I., Kräusslich H.G. HIV-1 assembly, budding, and maturation // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – V. 2. – № 7.
214. Suslov E.V., Mozhaytsev E.S., Korchagina D.V., Bormotov N.I., Yarovaya O.I., Volcho K.P., Serova O.A., Agafonov A.P., Maksyutov R.A., Shishkina L.N., Salakhutdinov N.F. New chemical agents based on adamantane–monoterpene conjugates against orthopoxvirus infections // RSC Medicinal Chemistry. – 2020. – V. 11. – № 10. – P. 1185-1195.
215. Swanstrom R., Coffin J. HIV-1 pathogenesis: the virus // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – V. 2. – № 12.
216. Takada A., Robison C., Goto H., et al. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein // PNAS. – 1997. – V. 94. – № 26. – P. 14764-14769.
217. Tan Q., Zhu Y., Li J., et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor – HIV entry inhibitor maraviroc complex // Science. – 2013. – V. 341. – P. 1387-1390.
218. Temesgen Z., Siraj D.S. Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor // Therapeutics and Clinical Risk Management. – 2008. – V. 4. – № 2. – P. 493-500.
219. Tomaras G.D., Ferrari G., Shen X., Alam S.M., Liao H.X., Pollara J., et al. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG // PNAS. – 2013. – V. 110. – № 22. – P. 9019-9024.
220. Usach I., Melis V., Peris J.E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review on pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability // Journal of the International AIDS Society. – 2013. – V. 16. – № 1.
221. van Gils M.J., Sanders R.W. In vivo protection by broadly neutralizing HIV antibodies // Trends in Microbiology. – 2014. – V. 22. – P. 550–551.
222. Varghese V., Mitsuya Y., Fessel W.J., Liu T.F., Melikian G. L., Katzenstein D.A., Schiffer C.A., Holmes S.P., Shafer R.W. Prototypical recombinant multi-protease-inhibitor-resistant infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – V. 57. – № 9. – P. 4290-4299.

223. Veljkovic N., Vucicevic J., Tassini S., Glisic S., Veljkovi, V., Radi M. Preclinical discovery and development of maraviroc for the treatment of HIV // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2015. – V. 10. – № 6. – P. 671-684.
224. Vicenzi E., Poli G. Novel factors interfering with human immunodeficiency virus-type 1 replication in vivo and in vitro // *Tissue Antigens*. – 2013. – V. 81. – № 2. – P. 61-71.
225. Voronin Y., Chohan B., Emerman M., Overbaugh J. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are usually dominated by the major variants found in blood // *Journal of virology*. – 2007. – V. 81. – № 19. – P. 10232-10241.
226. Wagstaff K.M., Headey S., Telwatte S., Tyssen D., Hearps A.C., Thomas D.R., Tachedjian G., Jans D.A. Molecular dissection of an inhibitor targeting the HIV integrase dependent preintegration complex nuclear import // *Cellular microbiology*. – 2019. – V. 21. – № 1.
227. Wang Q., Zhang L. Broadly neutralizing antibodies and vaccine design against HIV-1 infection // *Frontiers of medicine*. – 2020. – V. 14. – № 1. – P. 30-42.
228. Wang Z., Hong K., Zhang J., Zhang L., Li D., Ren L., Liang H., Shao Y. Construction and characterization of highly infectious full-length molecular clones of a HIV-1 CRF07_BC isolate from Xinjiang // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 11.
229. Weber I.T., Agniswamy J. HIV-1 Protease: Structural Perspectives on Drug Resistance // *Viruses*. – 2009. – V. 1. – № 3. – P. 1110-1136.
230. Wei X., Decker J.M., Liu H., Zhang Z., Arani R.B., Kilby J.M., Saag M.S., Wu X., Shaw G.M., Kappes J.C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2002. – V. 46. – P. 1896-1905.
231. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant Δ G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines // *Journal of virological methods*. – 2010. – V. 169. – № 2. – P. 365-374.
232. WHO-UNAIDS Guidelines for Standard HIV Isolation and Characterization Procedures // *World Health Organization*. – 2002. – P. 1-146.

233. Wild C., Shugars D., Greenwell T., Mcdanal C., Matthews T. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus Type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection // PNAS. – 1994. – V. 91. – № 21. – P. 9770-9774.
234. Wire M.B., Shelton M.J., Studenberg S. Fosamprenavir // Clinical pharmacokinetics. – 2006. – V. 45. – № 2. – P. 137-168.
235. Wu J., Zhao C., Liu Q., Huang W., Wang Y. Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system // Vaccine. – 2017. – V. 35. – № 47. – P. 6387-6394.
236. Wu X., Yang Z.Y., Li Y., Hogerkorp C.M., Schief W.R., Seaman M.S., Zhou T., Schmidt S.D., Wu L., Xu L., et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1 // Science. – 2010. – V. 329. – № 5993. – P. 856–861.
237. Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G.Y., Liu K., et al. Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1 // Nature medicine. – 2018. – V. 24. – № 6. – P. 857-867.
238. Yang H., Nkeze J., Zhao R.Y. Effects of HIV-1 protease on cellular functions and their potential applications in antiretroviral therapy // Cell & bioscience. – 2012. – V. 2. – № 1. – P. 32.
239. Ye L., Wen Z., Dong K., Wang X., Bu Z., Zhang H., et al. Induction of HIV neutralizing antibodies against the MPER of the HIV envelope protein by HA/gp41 chimeric protein-based DNA and VLP vaccines // PloS one. – 2011. – V. 6. – № 5.
240. Zagury D., Bernard J., Cheynier R., Desportes I., Leonard R., Fouchard M., et al. A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1 induced by a candidate vaccine against AIDS // Nature. – 1987. – V. 332. – № 6166. – P. 728-731.
241. Zaitsev B.N., Taranov O.S., Rudometova N.B., Shcherbakova N.S., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2019. – V. 23. – P. 337-342.

242. Zhan P., Chen X., Li D., Fang Z., De Clercq E., Liu X. HIV-1 NNRTIs: structural diversity, pharmacophore similarity, and implications for drug design // *Medicinal research reviews*. – 2013. – V. 33 (S1). – P. E1-E72.
243. Zhang L., Lei S., Xie H., Li Q., Liu S., Liu Q., Huang W., Xiao X., Wang Y. Screening and Identification of Marburg Virus Entry Inhibitors Using Approved Drugs // *Virologica Sinica*. – 2019. – P. 1-5.
244. Zhang X., Yan F., Tang K., Chen Q., Guo J., Zhu W., He S., Banadyga L., Qiu X., Guo Y. Identification of a clinical compound losmapimod that blocks Lassa virus entry // *Antiviral research*. – 2019. – V. 167. – P. 68-77.
245. Zhao G., Du L., Ma C., Li Y., Li L., Poon V.K., Wang L., Yu F., Zheng B.J., Jiang S., et al. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV // *Virology journal*. – 2013. – V. 10. – № 1. - P. 1-8.
246. Zhu P., Liu J., Bess J., Chertova E., Lifson J.D., Grisé H., et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes // *Nature*. – 2006. – V. 441. – P. 847-852.
247. Zhu Y., Zhang X., Wang C., Chen B., Wang Q., Xu W., Ye S., Jiang S., Zhang R. Crystal structure of refolding fusion core of Lassa virus GP2 and design of Lassa virus fusion inhibitors // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – V. 10.
248. Zyryanova D.P., Totmenin A.V., Bogacheva N.V., Gashnikova N.M. Construction and Characterization of Infectious Molecular Clones of HIV-1 CRF63_02A6 // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2020. – V. 36. – № 3. – P. 227-233.

Приложение 1

Данные образцов, включенных в исследование

Код сыворотки	Дата постановки диагноза	Дата сбора образца	Пол	Путь передачи	Возраст	Прием ВААПТ	Регион
16RU01	2015	2016	Ж	ГС	34	Нет	Новосибирская область
16RU03	2015	2016	М	ПИН	40	Нет	Новосибирская область
16RU04	2015	2016	М	ПИН	41	Нет	Новосибирская область
16RU05	2015	2016	Ж	ГС	35	Нет	Новосибирская область
16RU06	2015	2016	Ж	ГС	31	Нет	Новосибирская область
16RU07	2015	2016	М	ГС	31	Нет	Новосибирская область
16RU08	2015	2016	М	ПИН	32	Нет	Новосибирская область
16RU10	2015	2016	Ж	ПИН	34	Нет	Новосибирская область
16RU11	2015	2016	М	ГС	30	Нет	Новосибирская область
16RU12	2014	2016	М	ПИН	34	Нет	Новосибирская область
16RU64	2014	2016	М	ГС	35	Нет	Новосибирская область
16RU67	2015	2016	Ж	ГС	27	Нет	Новосибирская область
16RU13	н.д.	2016	Ж	ПИН	50	Нет	Кемеровская область
16RU14	н.д.	2016	Ж	ГС	43	Нет	Кемеровская область
16RU15	н.д.	2016	М	ПИН	46	Нет	Кемеровская область
16RU16	н.д.	2016	М	ГС	34	Нет	Кемеровская область
16RU18	н.д.	2016	М	ПИН	37	Нет	Кемеровская область
16RU19	н.д.	2016	М	ПИН	33	Нет	Кемеровская область
16RU20	н.д.	2016	М	ГС	32	Нет	Кемеровская область
16RU21	н.д.	2016	М	ПИН	40	Нет	Кемеровская область
16RU22	н.д.	2016	М	ПИН	34	Нет	Кемеровская область
16RU23	н.д.	2016	Ж	ГС	41	Нет	Кемеровская область

Продолжение таблицы

16RU39	н.д.	2016	М	ПИН	46	Нет	Кемеровская область
16RU42	н.д.	2016	Ж	ПИН	33	Нет	Кемеровская область
16RU43	н.д.	2016	Ж	ПИН	31	Нет	Кемеровская область
16RU48	н.д.	2016	М	ГС	34	Нет	Кемеровская область
16RU49	н.д.	2016	М	ГС	33	Нет	Кемеровская область
16RU53	н.д.	2016	Ж	ПИН	32	Нет	Кемеровская область
16RU54	н.д.	2016	М	ГС	45	Нет	Кемеровская область
16RU58	н.д.	2016	Ж	ГС	39	Нет	Кемеровская область
16RU61	н.д.	2016	М	ПИН	38	Нет	Кемеровская область
16RU26	2016	2016	М	ПИН	31	Нет	Алтайский край
16RU27	2016	2016	Ж	ГС	29	ЗТС, АВС, EFV	Алтайский край
16RU28	2016	2016	Ж	ГС	37	Нет	Алтайский край
16RU29	2016	2016	Ж	ГС	46	Нет	Алтайский край
16RU30	2016	2016	Ж	ГС	36	AZT, ЗТС, EFV	Алтайский край
16RU31	2016	2016	М	ПИН	42	Нет	Алтайский край
16RU33	2016	2016	Ж	ПИН	37	Нет	Алтайский край
16RU34	2015	2016	Ж	ПИН	25	Нет	Алтайский край
16RU35	2014	2016	М	ПИН	29	ЗТС, АВС, EFV	Алтайский край
16RU36	2016	2016	Ж	ГС	27	Нет	Алтайский край
16RU37	2016	2016	Ж	ГС	60	Нет	Алтайский край
16RU38	2016	2016	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	Алтайский край
18RU01GA	2018	2018	М	ГС	62	TDF, EFV, ЗТС	Республика Алтай

Продолжение таблицы

18RU03GA	2018	2018	М	н.д.	24	Нет	Республика Алтай
18RU04GA	2017	2018	Ж	ГС	33	TDF, EFV, ZDV	Республика Алтай
18RU05GA	н.д.	2018	М	н.д.	42	Нет.	Республика Алтай
18RU06GA	2018	2018	М	ПИН	32	ЗТС, LPV/г	Республика Алтай
18RU07GA	2018	2018	Ж	ГС	43	ABC, LPV/г, ЗТС	Республика Алтай
18RU08GA	2018	2018	Ж	ГС	62	TDF, EFV, ЗТС	Республика Алтай
18RU09GA	2018	2018	М	ГС	45	EFV, ЗТС	Республика Алтай
18RU10GA	2018	2018	М	ГС	52	Нет	Республика Алтай
18RU11GA	н.д.	2018	Ж	ГС	41	Нет	Республика Алтай
18RU13GA	2017	2018	М	ГС	33	TDF, EFV, ЗТС	Республика Алтай
18RU14GA	2017	2018	Ж	ГС	44	TDF, EFV, ЗТС	Республика Алтай
18RU15GA	2017	2018	М	н.д.	58	TDF, EFV, ЗТС	Республика Алтай
18RU16GA	2016	2018	М	ГС	30	TDF, EFV, ЗТС	Республика Алтай
18RU17GA	2017	2018	М	ГС	33	Нет	Республика Алтай
18RU18GA	н.д.	2018	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU19GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU120GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU21GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU22GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU23GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU24GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай

Продолжение таблицы

19RU25GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU26GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU27GA	н.д.	2019	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU28GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU29GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU30GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU31GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU32GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU33GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU34GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU35GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU36GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU37GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU38GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU39GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU40GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU41GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU42GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU43GA	н.д.	2019	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU44GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU45GA	н.д.	2019	М	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU46GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
19RU47GA	н.д.	2019	Ж	н.д.	н.д.	н.д.	Республика Алтай
20RU02KH А	2019	2020	М	ПИН	52	н.д.	Республика Хакасия

Окончание таблицы

20RU03KH А	2018	2020	М	ПИН	43	н.д.	Республика Хакасия
20RU04KH А	2018	2020	Ж	ПИН	43	н.д.	Республика Хакасия
20RU05KH А	2018	2020	Ж	ГС	29	н.д.	Республика Хакасия
20RU06KH А	2018	2020	Ж	ГС	29	н.д.	Республика Хакасия
20RU07KH А	2019	2020	М	ГС	45	н.д.	Республика Хакасия
20RU09KH А	2016	2020	М	ПИН	35	н.д.	Республика Хакасия
20RU10KH А	2016	2020	М	ГС	36	н.д.	Республика Хакасия
20RU11KH А	2016	2020	Ж	ГС	27	н.д.	Республика Хакасия
20RU12KH А	2012	2020	Ж	ГС	40	н.д.	Республика Хакасия
20RU13KH А	2015	2020	М	ПИН	49	н.д.	Республика Хакасия
20RU14KH А	2010	2020	Ж	ГС	43	н.д.	Республика Хакасия
20RU15KH А	н.д.	2020	Ж	н.д.	41	н.д.	Республика Хакасия
20RU16KH А	2019	2020	М	ГС	30	н.д.	Республика Хакасия
20RU17KH А	2019	2020	Ж	ГС	43	н.д.	Республика Хакасия
20RU19KH А	2015	2020	М	ГС	51	н.д.	Республика Хакасия
20RU20KH А	2002	2020	М	ПИН	48	н.д.	Республика Хакасия
20RU21KH А	2008	2020	М	ПИН	36	н.д.	Республика Хакасия
20RU22KH А	2018	2020	М	ГС	38	н.д.	Республика Хакасия
20RU23KH А	2015	2020	Ж	ПИН	43	н.д.	Республика Хакасия
20RU24KH А	2016	2020	Ж	ГС	59	н.д.	Республика Хакасия
20RU25KH А	2016	2020	М	ГС	40	н.д.	Республика Хакасия

М, мужской; Ж, женский; ПИН, потребитель инъекционных наркотиков; ГС, гетеросексуальный путь; н.д., нет данных.