

На правах рукописи

Рудометова Надежда Борисовна

**Конструирование псевдовирусов 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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель Шербаков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: Писарев Владимир Митрофанович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией и главный научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов критических состояний ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского

Бабкин Игорь Викторович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «17» декабря 2021 г. в 12-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. 8(383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

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 миллиона 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 клетку, 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*-псевдовирюсов. 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 псевдовирюсов идентична структуре поверхностных гликопротеинов нативного вируса. Наконец, главным достоинством данной технологии является возможность получения широкой панели псевдовирюсов, экспонирующих поверхностные белки множества вирусных подтипов, что обеспечивает 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 псевдовirusы 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 псевдовirusов на основе актуальных циркулирующих штаммов ВИЧ-1.

Цель исследования

Конструирование *env*-псевдовirusов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации, в частности Сибирского федерального округа, и их использование для поиска ингибиторов проникновения вируса 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 *env*-псевдовirusы на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в Сибирском федеральном округе.
- 4) Провести анализ антивиральной активности библиотеки соединений на основе терпеноидов с использованием сконструированных *env*-псевдовirusов ВИЧ-1 и выявить классы производных терпеноидов, проявляющих антивиральную 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 А6, 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 А6.

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 подтипу А6.

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 А6 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), OH0692 (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.).

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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Анализ генетического разнообразия изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Западной Сибири, и получение и характеристика env-псевдовирусов ВИЧ-1 на их основе

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 в период с 2016 по 2020 годы. Из сывороток была выделена вирусная РНК ВИЧ-1 с использованием коммерческих наборов

для экстракции нуклеиновой кислоты из биологических образцов. Затем выделенные образцы РНК использовались для обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции с целью получения кДНК ВИЧ-1.

Вначале была проведена обратная транскрипция и амплификация участка PR-RT гена *pol*, кодирующего протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1. 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 1 приведены результаты анализа образцов из Новосибирской области.

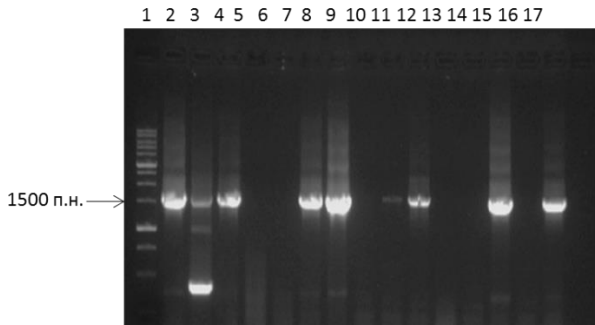


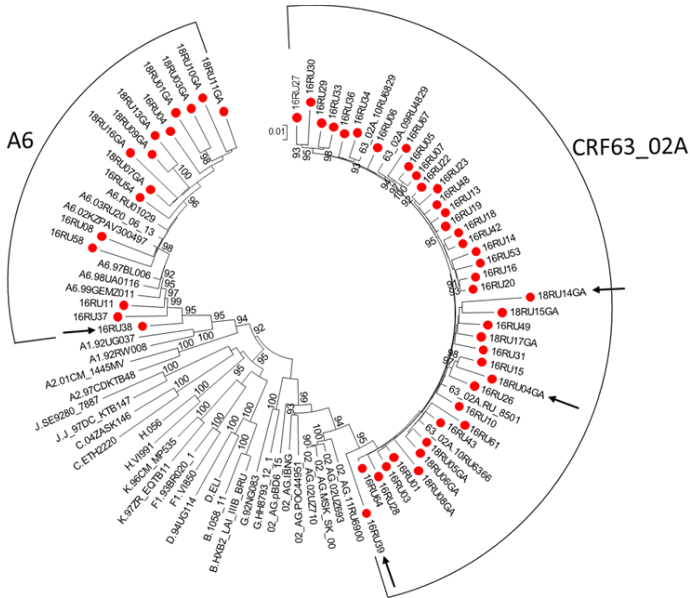
Рисунок 1 – Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР области PR-RT изолятов ВИЧ-1 из Новосибирской области (размер ПЦР-продукта – 1500 п.н.): 1 – маркер молекулярного веса ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); 2, 4, 7, 8, 10, 11, 14, 16 – положительные образцы; 3, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 15 – отрицательные образцы; 17 – отрицательный контроль (вода).

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 анализа, 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.

Филогенетический анализ с использованием программы IQ-TREE показал (рисунок 2А), 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 А6, а доля CRF63_02A составляет 33 %. Распределение подтипов по регионам представлено на рисунке 2Б.

А



Б



Рисунок 2 – А – Филогенетическое дерево максимального правдоподобия области PR-RT исследованных изолятов ВИЧ-1 Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края и Республики Алтай, 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 А6 (рисунок 3). 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).

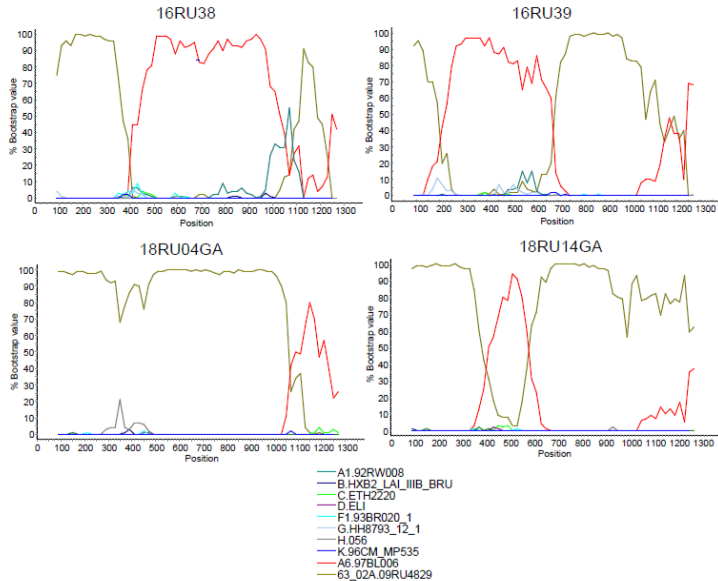


Рисунок 3 – Рекомбинационный анализ четырех последовательностей PR-RT CRF63_02A/A6. На горизонтальной оси отмечено положение нуклеотидов, начиная с 1 нуклеотида участка, кодирующего протеазу; по вертикальной оси отмечен процент кластеризации с кладами ВИЧ-1, использованными в анализе.

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 %). К полиморфным относят 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 нуклеозидным (M41L и K65R) и не-нуклеозидным (K103N) ингибиторам обратной транскриптазы (таблица 1). Обнаруженные мутации резистентности выявлены среди пациентов, не принимающих антиретровирусную терапию. У одного пациента в совокупности было обнаружено две мутации резистентности к АРП: K65R и K103N.

Таблица 1 – 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.

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 вначале получали ДНК-фрагменты, кодирующие ген *env*, с помощью обратной транскрипции и ПЦР-амплификации с использованием в качестве матрицы выделенных образцов РНК ВИЧ-1 из Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасии. На рисунке 4 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.

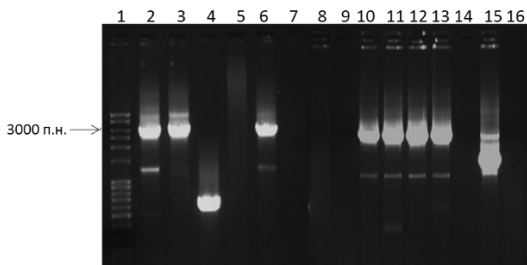


Рисунок 4 – Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР на область *env* изолятов из Республики Алтай (размер ПЦР-продукта – 3000 п.н.): 1 – маркер молекулярного веса ДНК 100 bp DNA Ladder Plus («PlasmidFactory», Германия); 2, 3, 6, 10, 11, 12, 13 – положительные образцы; 4, 5, 7, 8, 9, 14, 15 – отрицательные 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 5). Для каждого варианта *env* было получено от одного до пяти положительных клонов.

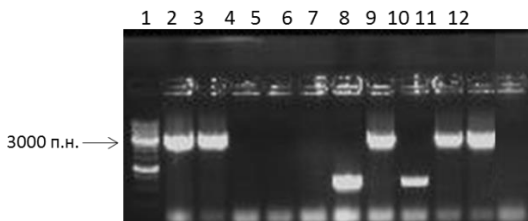


Рисунок 5 – Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР после скрининга колоний варианта *env* 19RU46GA: 1 – маркер молекулярного веса ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); 2, 3, 8, 10 – положительные клоны; 4, 5, 6, 7, 9 – клоны без вставки; 11 – положительный контроль (плазмида со вставкой гена *env*); 12 – отрицательный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

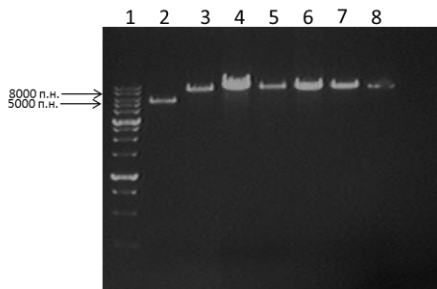


Рисунок 6 – Электрофореграмма разделения продуктов рестрикционного анализа генетических конструкций, содержащих полноразмерный ген *env*: 1 – маркер молекулярного веса ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); 2 – линейаризованный плазмидный вектор pсDNA3.1/V5-His ТОРО ТА без вставки (5523 п.н.), обработанный эндонуклеазой рестрикции *EcoR V*; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – линейаризованные 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 псевдовиралов и проводили их характеризацию. Сборку и выход псевдовиральных частиц подтверждали методом электронной микроскопии (рисунок 7).

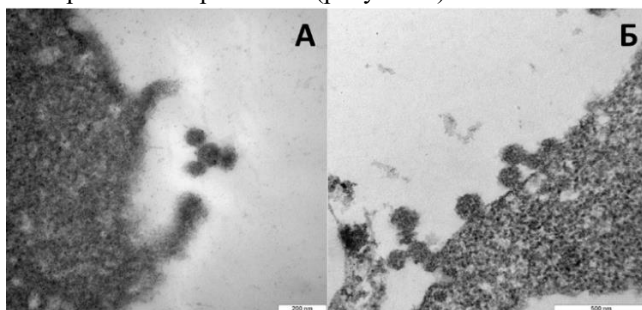


Рисунок 7 – А – Электронная микрофотография клеток 293Т после трансфекции с отпочковавшимися псевдовиральными частицами. Б – Псевдовиральные частицы разной степени созревания. Электронные микрофотографии сделаны Зайцевым Б.Н. и Тарановым О.С.

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*, 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 4 образцов из Алтайского края, 10 из Кемеровской области, 3 из Новосибирской области, 13 из Республики Алтай и 3 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 8). 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 псевдовирусов 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*-псевдовируса 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 псевдовирусных частиц в клетки-мишени. Клоны псевдовирусов 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*-псевдовиром подтипа B SF162.LS из референсной международной панели псевдовирусов.

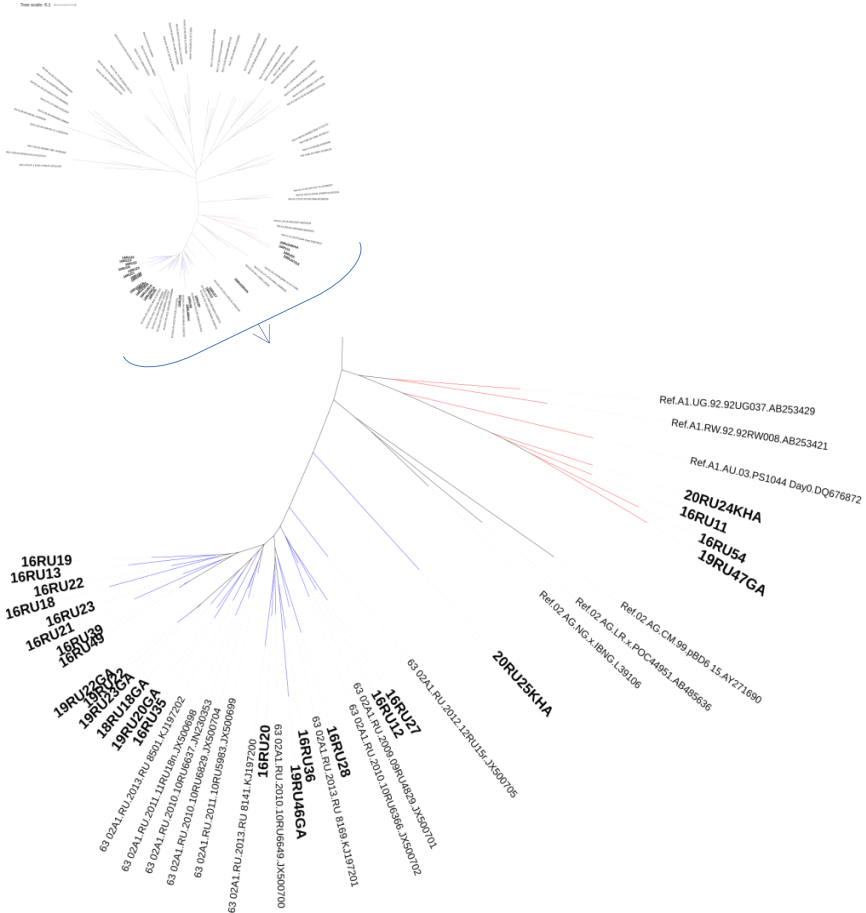


Рисунок 8 – Филогенетическое дерево максимального правдоподобия гена *env* исследованных изолятов ВИЧ-1 Новосибирской и Кемеровской областей, Алтайского края, Республики Алтай и Республики Хакасия (визуализировано с использованием онлайн-инструмента iTOL).

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 70).

Среди 13 функционально активных вариантов псевдовирусов 11 вариантов принадлежат к рекомбинантной форме CRF63_02A и 2 варианта к подтипу А6. Все варианты псевдовирусов являются CCR5-тропными (таблица 2).

Таблица 2 – 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 следующие bnAbs, полученные из коллекции НИИ по программе AIDS Reagent Program: VRC01 и 2G12 (нацелены на сайт взаимодействия с рецептором CD4), PG9 и PG16 (нацелены на V1/V2 петли), PGT126 (нацелено на область V3 петли), 2F5, 4E10, 10E8 (нацелены на 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 pTRJ04551.58 (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 9), большинство псевдовирусов оказались чувствительными к нейтрализации антителами VRC01, PGT126 и 10E8, проявили умеренную чувствительность к нейтрализации антителами PG9 и 4E10 и оказались устойчивыми к нейтрализации антителами 2G12, PG16 и 2F5. 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; Hrabec et al., 2017; Stefic et al., 2019).

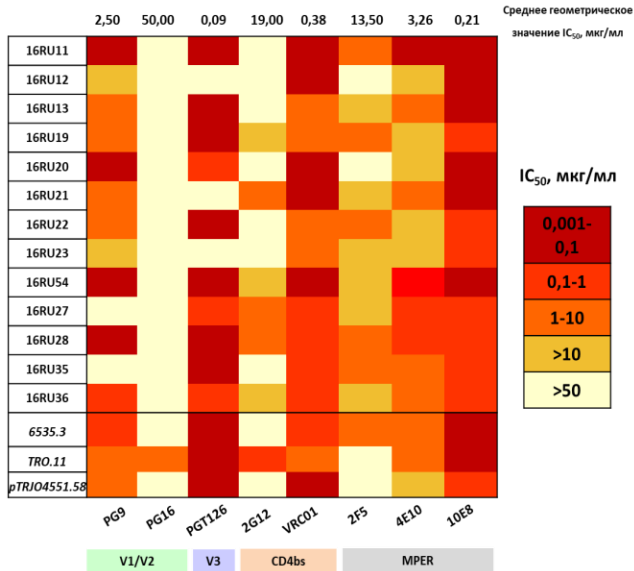


Рисунок 9 – Чувствительность *env*-псевдовирuсов к нейтрализации моноклональными широконейтрализующими антителами. V1/V2, V3, CD4bs, MPER – регионы уязвимости ВИЧ-1 на поверхности Env. V1/V2 – регион уязвимости, включающий N-связанные гликаны в позиции Asn160; V3 – регион уязвимости, который включает N-связанные гликаны в позиции Asn332; CD4bs – участок прикрепления gp120 к CD4; MPER – регион уязвимости, находящийся на С-конце трансмембранного гликопротеина gp41.

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

Следующей частью данной работы стали эксперименты по использованию псевдовирuсов для скрининга соединений с целью поиска таких веществ, которые были бы способны ингибировать слияние ВИЧ с клетками и предотвращать проникновение вируса. Ингибиторы слияния являются одним из перспективных классов препаратов для применения в качестве АРТ.

В качестве объекта исследования были выбраны производные терпеноидов, которые обладают ингибирующей активностью против ряда вирусoв. В частности, было установлено, что производные терпеноидов блокируют процессы проникновения вируса гриппа (Sokolova et al., 2017), обладают высокой активностью против филoвирuсов (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 и существуют агенты, которые 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 как влиять на слияние вируса с клеткой-мишенью, так и 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 было показано, 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 МКПК (Sasaki et al., 2002). Среди производных глицирризиновой кислоты были обнаружены соединения, 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 (НИОХ 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. Помимо этого, противовирусная активность была исследована для 11 препаратов, один из которых является природной глицирризиновой кислотой (ГК), выделяемой из солодки, и 10 препаратов, которые представляют собой смесь никотинатов глицирризиновой кислоты и являются преимущественно триникотинатами. Среди 10 препаратов триникотинатов глицирризиновой кислоты три препарата представляли собой дегидратированные формы никотинатов. Данные препараты отличались друг от друга вариантами синтеза и обработки реакционной смеси.

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_02А) (таблица 3).

Таблица 3 – Псевдовирусы, использованные для оценки ингибирующей активности производных терпеноидов

Псевдовиррус	Подтип	Ко-рецептор	Уровень чувствительности
SF162.LS	В	R5	1а
QH0692	В	R5	2
16RU28	CRF63_02А	R5	3
16RU54	А6	R5	2

Исследование соединений на способность блокировать проникновение псевдовирусов в клетки-мишени Tzm-bl включало два этапа: 1) анализ на цитотоксичность и 2) анализ на наличие ингибирующей активности (вируснейтрализация).

Вначале была оценена токсичность полученных соединений для клеточной линии Tzm-bl с использованием МТТ-теста и определена их 50 % цитотоксическая концентрация (СС50). МТТ-тест показал, что для производных изоборниламина диапазон СС50 составил 300–666,7 мкМ в отношении клеточной линии Tzm-bl; для сложных эфиров (-)-борнеола диапазон СС50 составил 54,6–500 мкМ; для производных гидразона камфоры диапазон СС50 составил 12,5–1000 мкМ; для глицирризиновой кислоты и ее производных диапазон СС50 составил 250-1000 мкМ (таблица 4).

Затем для каждого соединения был выбран диапазон нетоксичных концентраций, в которых исследовалась противовирусная активность. 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) маравирок (MVC, Селзентри).

Таблица 4 – Цитотоксичность тестируемых соединений в отношении клеточной линии Tzm-bl

П/п	CC50, мкМ	П/п	CC50, мкМ
Производные изоборниламина			
1	>342,5	6	>666,7
2	>342,5	7	300
3	>400	8	>300
4	>340,1	9	>300
5	>336,7		
Сложные эфиры (-)-борнеола			
10	208,9	21	>500
11	54,6	22	489
12	245	23	>500
13	269,1	24	346
14	>100	25	199,5
15	239	26	117,5
16	>500	27	316
17	>500	28	>100
18	>100	29	>100
19	102	30	>100
20	77,6		
Производные гидразона камфоры			
31	>500	42	>200
32	>500	43	>200
33	>100	44	31,25
34	12,5	45	125
35	>100	46	>1000
36	>100	47	250
37	>100	48	31,25
38	426,5	49	250
39	>100	50	250
40	>100	51	500
41	>200		
Производные глицирризиновой кислоты			
52	>1000	58	645
53	>1000	59	>950
54	>1000	60	524
55	>250	61	>1000
56	>250	62	490
57	>1000	63	>1000

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 адамантана ингибирующие свойства проявило соединение адамантилбромфениламин (рисунок 10).

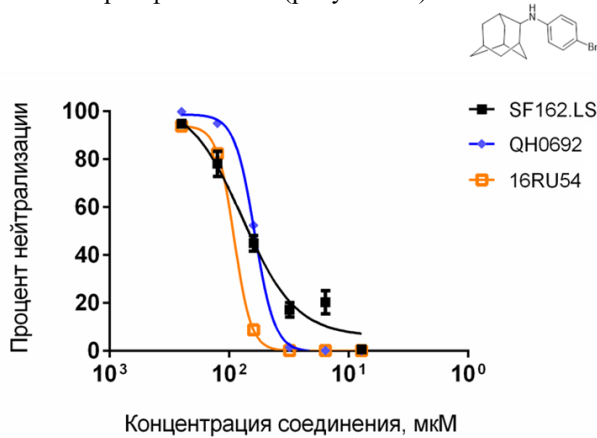


Рисунок 10 – Кривые нейтрализации адамантилбромфениламина в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1.

Данное соединение блокировало проникновение псевдовирусов подтипов В и А6 (таблица 5).

Таблица 5 – Ингибирующая активность адамантилбромфениламина в отношении *env*-псевдовирусов ВИЧ-1

Псевдовиррус	Адамантилбромфениламин		MVC
	IC ₅₀ , мкМ	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)	IC ₅₀ , мкМ
SF162.LS	69,5±6,92	4,3	0,002
QH0692	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 6).

Таблица 6 – Ингибирующая активность производных глицирризиновой кислоты в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1

Номер соединения	SF162.LS		OH0692		16RU28	
	IC50, мкМ	SI (CC50/IC50)	IC50, мкМ	SI (CC50/IC50)	IC50, мкМ	SI (CC50/IC50)
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 исследовались; н. а. – активность отсутствует.

Данный препарат ингибировал проникновение псевдовирuсов подтипа В и рекомбинантной формы CRF63_02А в клетку-мишень (рисунок 11).

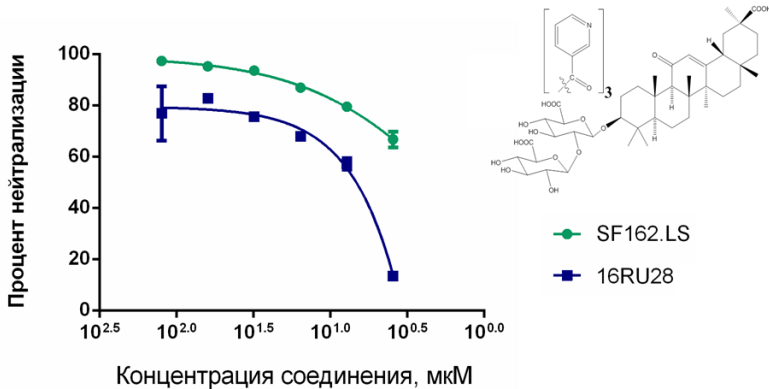


Рисунок 11 – Кривые нейтрализации препарата 54 в отношении *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1.

Интересно отметить, что глицирризиновая кислота в анализе нейтрализации с *env*-псевдовирuсами не проявила какой-либо ингибирующей активности в отношении псевдовирuсов 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 препарат 54, был проведен эксперимент по исследованию ингибирующей активности в зависимости от времени его добавления к инфицированным псевдовirusами клеткам (TOA, time of addition assay). TOA представляет собой ценный инструмент для определения механизма действия противовирусных препаратов. 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 определенном этапе цикла репликации или до него подавляет репликацию вируса; когда же ингибитор добавляется после определенного целевого этапа, репликация вируса подавляться не будет (Van Loock et al., 2013). Так, в ряде работ было показано, что ингибиторы проникновения (маравирик и T20) проявляют максимальную ингибирующую активность в течение одного-двух часов после инфицирования клеток-мишеней вирусом; ингибитор обратной транскриптазы (азидотимидин) проявляет ингибирующую активность в течение 6-9 часов после инфицирования вирусом; ингибитор интегразы (ралтегравир) проявляет ингибирующую активность в течение 9 часов (Donahue et al., 2010; Lara et al., 2014; Daelemans et al., 2011; Wang et al., 2018).

Эксперимент TOA был проведен с использованием псевдовirusа 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), осуществляли одновременное внесение препаратов и псевдовirusов к клеткам (0 ч) и добавляли препараты через 30 (0,5 ч), 60 (1 ч), 120 (2 ч), 180 (3 ч) и 240 минут (4 ч) после заражения клеток псевдовirusами соответственно (рисунок 12А).

Представленные на рисунке 12Б 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 данный препарат воздействует на этап проникновения вируса в клетку.

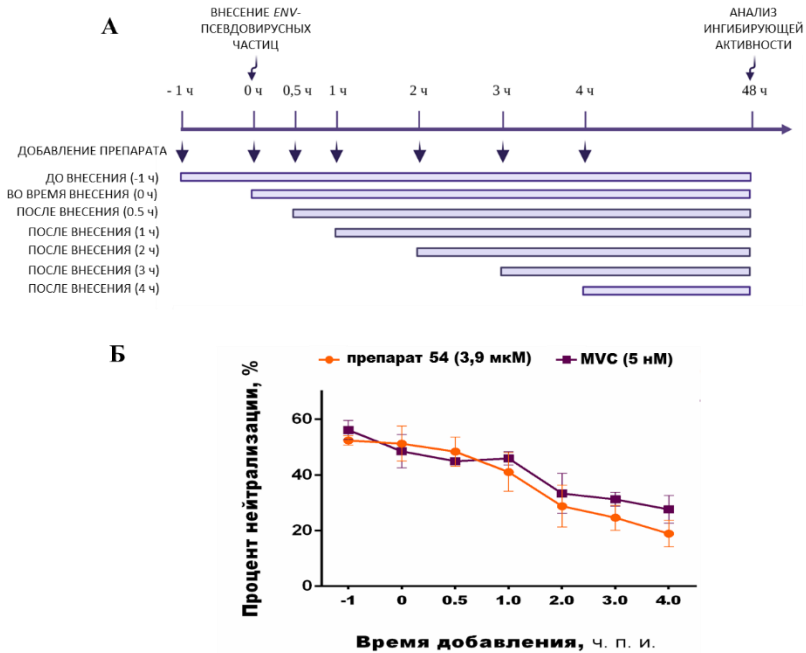


Рисунок 12 – А – схема добавления препаратов; Б – влияние различных режимов добавления препарата 54 и MVC (маравирик) на эффективность псевдовиральной инфекции. -1 – инкубация клеток с препаратами в течение 1 часа, а затем добавление суспензии псевдовирусов; 0 – одновременное добавление препаратов и суспензии псевдовируса к клеткам; 0,5, 1, 2, 3, 4 ч – добавление препаратов к клеткам через 30, 60, 120, 180 и 240 минут после инфицирования клеток псевдовирусами; ч. п. и. – часы после инфицирования клеток псевдовирусными частицами.

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 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*-псевдовирuсов, которые относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A и подтипу А6 ВИЧ-1 и являются ССR5-тропными. Исследован спектр чувствительности полученных псевдовирuсов к нейтрализации моноклональными широконейтрализующими антителами. Установлено, что полученные псевдовирuсы 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*-псевдовирuсов проведено исследование противовирuсной активности 58 производных терпеноидов, из которых 10 препаратов продемонстрировали противовирuсную 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 противовирuсную активность в отношении псевдовирuсов, включенных в международную панель – SF162.LS (IC₅₀=69,5 мкМ и SI=4,3), OH0692 (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 противовирuсную активность в отношении псевдовирuсов 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 псевдовирuсной инфекции в зависимости от времени его добавления к инфицированным псевдовирuсами клеткам-мишеням позволяет предположить, что данный препарат проявляет ингибирующие свойства на этапе проникновения вирuса в клетку.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Rudometova N.B.**, Shcherbakova N.S., Shcherbakov D.N., Mishenova E.V., Delgado E., Ilyichev A.A., Karpenko L.I., Thomson M.M. Genetic diversity and drug resistance mutations in reverse transcriptase and protease genes of HIV-1 isolates from Southwestern Siberia // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2021. – V. 37 (9). – P. 716-723.

2. Ковалева К.С., Яровая О.И., Гатилов Ю.В., Слита А.В., Есаулкова Я.Л., Зарубаев В.В., **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Салахутдинов Н.Ф. Синтез и противовирусная активность N-гетероциклических производных гидразонов камфоры и фенхона // Химия гетероциклических соединений. – 2021. – Т. 57 (4). – С. 455-461.

3. Зайцев Б.Н., Таранов О.С., **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Ильичев А.А., Карпенко Л.И. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23 (3). – С. 337-342.

4. Rudometov A.P., Chikaev A.N., **Rudometova N.B.**, Antonets D.V., Lomzov A.A., Kaplina O.N., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. 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.

Тезисы на всероссийских и международных конференциях

1. **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Мишенева Е.В., Дельгадо Е., Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Томсон М. Генетическое разнообразие изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на юге Западной Сибири // Сборник тезисов Международной конференции «Эпидемиологическое благополучие» (Москва, 20–21 апреля 2021 года). – С. 201-202.

2. **Рудометова Н.Б.**, Щербаков Д.Н., Фандо А.А., Фоменко В.В., Соколова А.С., Яровая О.И., Карпенко Л.И. Производные терпеноидов, способные блокировать проникновение env-псевдовирусов ВИЧ-1 в клетку-мишень // Сборник тезисов Международной конференции «Эпидемиологическое благополучие» (Москва, 20–21 апреля 2021 года). – С. 199-200.

3. **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И., Соколова А.С., Яровая О.И. Скрининг панели соединений на основе монотерпеноидов на способность блокировать проникновение псевдовирусов ВИЧ-1 в клетку-мишень // Сборник тезисов VII Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2020. – Кольцово, 2020. – С. 542-543.

4. **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Соколова А.С., Яровая О.И., Карпенко Л.И. Поиск новых ингибиторов проникновения с

использованием панели псевдовирюсов ВИЧ-1 // Материалы V Санкт-Петербургского форума по ВИЧ-инфекции с международным участием. – СПб., 2020. – С. 173-174.

5. **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Мишенева Е.В., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И. Субтипическая принадлежность изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Республики Алтай // Материалы IV Санкт-Петербургского форума по ВИЧ-инфекции с международным участием. 30-летие СПб Центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. – СПб., 2019. – С. 146-147.

6. **Рудометова Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Карпенко Л.И. Использование панели псевдовирюсов ВИЧ-1 на основе изолятов, циркулирующих на территории РФ, для оценки кандидатных вакцин против ВИЧ-1 и скрининга соединений, блокирующих проникновение ВИЧ-1 // Сборник тезисов VI Конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio». – Кольцово, 2019. – С. 607-610.

7. **Рудометова Н.Б.**, Щербаков Д.Н., Соколова А.С., Яровая О.И., Карпенко Л.И., Щербакова Н.С. Создание панели псевдовирюсов ВИЧ-1 на основе изолятов, циркулирующих на территории СФО РФ, для поиска новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 // Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии: Сборник тезисов докладов Пятой Междисциплинарной конференции (15-18 сентября 2019 г., Судак, Крым, Российская Федерация). - С. 248.

8. **Андреева Н.Б.**, Щербакова Н.С. Региональная панель env-псевдовирюсов ВИЧ-1 – как инструмент для оценки гуморального иммунного ответа // Материалы V Конгресса Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (16-18 мая 2018, г. Новосибирск). Журнал инфектологии. 2018. Т. 10, №2, приложение № 1. С. 15.

9. **Андреева Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Карпенко Л.И. Получение и описание env-псевдовирюсов ВИЧ-1 на основе изолятов, циркулирующих в Сибирском федеральном округе // Сборник тезисов VI международной Конференции по ВИЧ/СПИДу в Восточной Европе и Центральной Азии. – Москва, 18-20 апреля, 2018.

10. **Андреева Н.Б.**, Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н., Рудометов А.П., Карпенко Л.И. Определение субтипической принадлежности изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области и Алтайском крае, и создание на их основе панели псевдовирюсов // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Женщины и ВИЧ». – Санкт-Петербург, 5-6 июня, 2017. – С. 20-23.