

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**
(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **18124**

(13) **С1**

(46) **2014.04.30**

(51) МПК

C 12N 7/01 (2006.01)

(54) **РЕКОМБИНАНТНАЯ ФОРМА ВИЧ-1/Mos: ВА (В^{gag}А^{pol}А^{env})
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОМА И ЭВОЛЮЦИИ ВИРУСА ВИЧ-1
ИЛИ СКОРОСТИ ЕГО ИЗМЕНЧИВОСТИ**

(21) Номер заявки: а 20110563

(22) 2011.04.29

(43) 2012.12.30

(71) Заявитель: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии" (ВУ)

(72) Авторы: Еремин Владимир Федорович; Гасич Елена Леонидовна; Со-синович Святослав Викторович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии" (ВУ)

(56) МАШАРСКИЙ А.Э. Изучение генетического разнообразия и анализ генома ВИЧ-1 в странах бывшего СССР: Автореф. дис. - Санкт-Петербург, 2005. - С. 4-14.

СУХАНОВА А.Л. и др. Вопросы вирусологии. - 2004. - Т. 49. - № 6. - С.4-9.
LIITSOLA K. et al. AIDS. - 1998. - V. 12. - No. 14. - P.1907-1919.

LUKASHOV V.V. et al. AIDS Res Hum Retroviruses. - 1999. - V. 15. - No. 17. - P. 1577-1583.

БОБКОВ А.Ф. и др. Вопросы вирусологии. - 2000. - Т. 45. - № 6. - С. 17-19.

(57)

Рекомбинантная форма ВИЧ-1/Mos: ВА (В^{gag}А^{pol}А^{env}), депонированная в EMBL/GenBank/DDBJ по генам gag, pol и env под номерами соответственно FR775442.1, FN995656.1 и FR775443.1, предназначенная для изучения генома и эволюции вируса ВИЧ-1 или скорости его изменчивости.

Изобретение относится к вирусологии и молекулярной биологии, а именно к выделению нового варианта рекомбинантной формы вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) ВА (В^{gag}А^{pol}А^{env}) для научных целей - изучения генома вируса, эволюции ВИЧ-1, скорости его изменчивости.

В настоящее время выделяют два типа ВИЧ: ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Пандемия ВИЧ-инфекции связана с ВИЧ-1. ВИЧ-2, в основном, выявляется в Западной Африке, хотя отдельные случаи ВИЧ-инфекции, связанные с ВИЧ-2, были описаны в Восточной Африке, Европе (в том числе и в Белоруссии), Азии, Северной и Южной Америке [1-6].

Филогенетический анализ штаммов ВИЧ-1, изолированных в разных географических регионах, показал, что все эти вирусы могут быть выделены в группы, субтипы и циркулирующие рекомбинантные формы (CRFs) [7, 8, 9, 10]. Выделяют три группы или линии ВИЧ-1: М (Major), N (non-M, non O или New) и О (Outliers). Большинство изолятов ВИЧ-1,

ВУ 18124 С1 2014.04.30

BY 18124 C1 2014.04.30

ответственных за пандемию ВИЧ-инфекции, относятся к группе М. Вирусы группы О эндемичны и выявляются, в основном, в Камеруне и соседних странах Западной и Центральной Африки [11,12, 13]. Группа N объединяет вирусы, изолированные в Камеруне [14, 15].

Внутри группы М все вирусы филогенетически делят на субтипы. В настоящее время выделяют девять субтипов, обозначенных латинскими буквами: А-D, F-H, J и К. Вирусы группы О не делятся на субтипы, поскольку при филогенетическом анализе не выявляется такое же разнообразие геномов ВИЧ, как в группе М.

В настоящее время используются четыре типа категорий для обозначения главной линии ВИЧ-1: группы, субтипы, суб-субтипы и CRFs (Circulating Recombinant Forms).

Группы обозначают характерные линии ВИЧ-1: М, N и О. Группа М включает вирусы, которые доминируют в глобальной эпидемии. Группы были обозначены М для основных, О для outlier, N для не М - не О [15].

Субтипы обозначают главные кластеры внутри группы М.

Суб-субтипы обозначают разные линии, которые очень близко родственны к отдельным линиям субтипов, но не являются достаточно генетически отдаленными для присвоения им нового субтипа. Ранее определенный субтип А может быть таким образом переименован в суб-субтип А1 и гипотетически в заново определенную линию, названную суб-субтип А2.

Циркулирующие рекомбинантные формы (CRF) представляют собой рекомбинантные линии, которые играют важную роль в пандемии ВИЧ-1. Члены CRF должны иметь идентичную мозаичную структуру, то есть они произошли в результате одинаковых рекомбинантных событий.

Как оказалось, все субтипы ВИЧ-1 ассоциированы с различными территориями и континентами. Субтип В типичен для Северной и Южной Америки, Западной Европы, Африки, стран юго-восточной Азии, Австралии, Японии; А, С и Д - для Африки (С описан еще в Индии); Е - для Таиланда; F описан в Румынии и Бразилии; G - в Центральной Африке, на Тайване, Заире и г. Элисте (Россия); Н - в центральной Африке, Заире и Восточной Европе; I - на Кипре Ближнем Востоке; J - в центральной Африке [16, 17, 18, 19, 20, 21].

Известна рекомбинантная форма ВИЧ-1 CRF03_AB, AF193276.1 (GenBank) HIV-1 CRF03_AB KAL153 и AF414006.1 (GenBank) 98BY10443 Belarus, описанная в Калининграде и Беларуси соответственно. Однако оба этих вируса имеют следующую структуру генома: gagA, polB, envB.

Задачей изобретения является описание нового отечественного варианта рекомбинантной формы ВИЧ-1 для изучения генома и эволюции вируса ВИЧ-1 или скорости его изменчивости. Результат достигается путем секвенирования и анализа последовательностей генома новой рекомбинантной формы вируса иммунодефицита человека типа I Mos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300068202?report=genbank>.

Получение последовательностей новой рекомбинантной формы ВИЧ-1 BA ($B^{gag}A^{pol}A^{env}$) - изолят Mos.

РНК вируса была изолирована из плазмы крови ВИЧ-инфицированного ребенка-девочки Mos., 2004 г.р., г. Минск. В настоящее время клинически находится в стадии А1 на момент забора крови для выделения вируса. Клинический материал получен из Минской городской детской инфекционной клинической больницы, изоляция РНК вируса проведена в лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций, отдела клинической вирусологии в ГУ "РНПЦ эпидемиологии и микробиологии" Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Новая рекомбинантная форма ВИЧ-1 BA ($B^{gag}A^{pol}A^{env}$) по генам gag, pol и env депонирована в Международную базу данных EMBL/Genbank/DDBJ под номерами: FR775442.1 (21.01.2011) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/-FR775442.1>, FN995656.1 (от 02.07.2010) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/300068202?report=genbank>, FR775443.1 (21.01.2011) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR775443.1>.

При получении данной рекомбинантной формы использованы методы молекулярной биологии: выделение вируса высокоскоростным центрифугированием, выделение РНК, проведение реакции обратной транскрипции, проведение полимеразной цепной реакции, проведение секвенирующей ПЦР по фрагментам структурных генов gag; pol; env, проведение электрофоретического разделения полученных фрагментов на генетическом анализаторе ABI Prism 3100 Avant, анализ полученных после электрофоретического разделения фрагментов с использованием компьютерных программ Sequencing Analysis, SeqScape, BioEdit, филогенетический анализ фрагментов ДНК по структурным генам gag; pol; env с использованием компьютерной программы MEGA4.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью компьютерных программ Sequencing Analysis, SeqScape. и BioEdit.

Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов были выровнены, в них были найдены рамки считывания и получены соответствующие аминокислотные последовательности. Для филогенетического анализа полученные нуклеотидные последовательности были выровнены с нуклеотидными последовательностями референсных изолятов ВИЧ-1, взятых из базы данных полных нуклеотидных последовательностей геномов различных штаммов ВИЧ-1 с помощью программы Clustal W. Филогенетический анализ проводили с использованием пакета программ PHYLIP. Для анализа геномов ВИЧ-1 на наличие рекомбинации применяли программу SimPlot.

Свойства новой рекомбинантной формы ВИЧ-1 ВА ($B^{gag}A^{pol}A^{env}$).

Средние р-расстояния (определяющие степень гомологии между вирусами), определенные нами с помощью компьютерной программы MEGA4.1, между изолятом ВИЧ-1/Mos и референс последовательностями субтипа А ВИЧ-1 из России, Украины составили 0,068, а с референс последовательностями субтипа В - 0,094. Ближе всего изолят ВИЧ-1/Mos располагался к украинскому изоляту AF413987 субтипа А, р-расстояния составили 0,066. При сравнении последовательностей по гену pol изолята ВИЧ-1/Mos с референс последовательностями рекомбинантной формы CRF03_AB из Беларуси и Калининграда (AF414006.1, Belarus и AF193276.1 CRF03_AB KAL153) было показано, что средние р-расстояния составляют 0,090, в то время как средние р-расстояния между референс штаммами составили 0,009. Таким образом было показано, что по гену pol изолята ВИЧ-1/Mos относится к субтипу А ВИЧ-1.

При сравнении последовательностей ДНК изолята ВИЧ-1/Mos по фрагменту гена gag участка p17/p24 с референс последовательностями ВИЧ-1 субтипа А было определено, что средние р-расстояния составили 0,129, а с референс последовательностями субтипа В - 0,075. Средние р-расстояния между последовательностями гена gag изолята ВИЧ-1/Mos с последовательностями рекомбинантной формы CRF03_AB ВИЧ-1 (AF414006.1, Belarus и AF193276.1 CRF03_AB KAL153) составили 0,121 в сравнении с 0,013 при сравнении рекомбинантных вирусов между собой. Таким образом, по гену gag вирус был отнесен к субтипу В. При анализе изолята ВИЧ-1/Mos по гену env средние р-расстояния с референс последовательностями субтипа В составили 0,323, а с субтипом А - 0,155. Средние р-расстояния по гену env изолята ВИЧ-1/Mos и рекомбинантного вируса CRF03_AB AF414006.1 и AF193276.1 составили 0,308. Таким образом по гену env вирус был отнесен к субтипу А ВИЧ-1.

Таким образом, полученный нами изолят ВИЧ-1/Mos является рекомбинантной формой ВИЧ-1 и имеет следующую структуру: $B^{gag}A^{pol}A^{env}$ - в отличие от известной рекомбинантной формы CRF03AB, имеющей структуру: $(A^{gag}B^{pol}B^{env})$.

Результаты проведенных исследований показали, что при филогенетическом анализе по участку гена pol изолят ВИЧ-1/Mos кластрировался вместе с ВИЧ-1 субтипа А, но отдельно от других анализируемых образцов субтипа А и референс штамма субтипа А (AF004885).

Приведенные примеры раскрывают сущность изобретения.

Пример 1.

Секвенирование изолята ВИЧ-1/Mos по гену gag (p17/p24), представлены на фиг. 1

Пример 2.

Секвенирование изолята ВИЧ-1/Mos по гену pol, представлены на фиг. 2.

Пример 3.

Секвенирование изолята ВИЧ-1/Mos по гену env (V3 петля gp120), представлены на фиг. 3.

На фиг. 4 представлен филогенетический анализ фрагмента ДНК изолята ВИЧ-1/Mos по участку гена gag.

На фиг. 5 представлен филогенетический анализ фрагмента ДНК изолята ВИЧ-1/Mos по участку гена pol.

На фиг. 6. представлен филогенетический анализ фрагмента ДНК изолята ВИЧ-1 /Mos по участку гена env.

Источники информации:

1. Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., et al./ Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS // Science. - 1986. - V. 233. - P. 343-346.

2. Albert J., Bredberg U., Chiodi F., et al. / A new human retroviruses isolate of west African origin and its relationship to HTLV-IV, LAV-II and HTLV-IIIB// AIDS Res Hum Retrov. - 1987. - V. 3. - P. 3-10.

3. Gao F., Yue L., Robertson D., et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: Evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology // J Virol. - 1994. - V. 68. - P. 7433-7447.

4. Dietrich U., Adamski M., Kreutz R., et al./A highly divergent HIV-2-related isolate// Nature. - 1989. - V. 342. - P. 948-950.

5. Valadas E, França L, Sousa S, Antunes F. 20 years of HIV-2 infection in Portugal: trends and changes in epidemiology // Clin Infect Dis. - 2009. - V. 15. - P. 1166-1167.

6. Dougan S., Patel B., Tosswill J.H., Sinka K. Diagnoses of HIV-1 and HIV-2 in England, Wales, and Northern Ireland associated with west Africa // Sex Transm Infect. - 2005. - V. 81. - P. 338-41.

7. Robertson D.L., Hahn B.H., Sharp P.M. Recombination in AIDS viruses // J Mol Evol. - 1995. - V. 40. - P. 249-259

8. Robertson D.L., Anderson J.P., Bradac J.A., Carr J.K., Foley B., Funkhouser R.K., Gao F., Hahn B.H., Kalish M.L., Kuiken C., Learn G.H., Leitner T., McCutchan F., Osmanov S., Peeters M., Pieniazek D., Salminen M., Sharp P.M., Wolinsky S., Korber B. HIV-1 nomenclature proposal // Science. - 2000. - V. 288. - P. 55-56.

9. Robertson D.L., Anderson J.P., Bradac J.A., Carr J.K., Foley B., Funkhouser R.K., Gao F., Hahn B.H., Kalish M.L., Kuiken C., Learn G.H., Leitner T., McCutchan F., Osmanov S., Peeters M., Pieniazek D., Salminen M., Sharp P.M., Wolinsky S., Korber B. HIV-1 nomenclature proposal // Human Retroviruses and AIDS. - 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Kuiken C.L., Foley B., Hahn B., Korber B., McCutchan F., Marx P.A., Mellors J.W., Mullins J.I., Sodroski J. and Wolinsky S. Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.

10. Vanden Haesevelde M., Decourt J.L., De Leys R.J., Vanderborcht B., van der Groen G., van Heuverswijn H., Saman E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate // J Virol. -1994. - V. 68. - P. 1586-1596.

11. Mauclore P., Loussert-Ajaka I., Damond F., Fagot P., Souquieres S., Monny Lobe M., Mbopi Keou F.X., Barre-Sinoussi Saragosti S., Brun-Vezinet F., Simon F. Serological and viro-

BY 18124 C1 2014.04.30

logical characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon // AIDS. - 1997. - V. 11. - P. 445-453.

12. Peeters M., Gueye A., Mboup S., Bibollet-Ruche F., Ekaza E., Mulanga C., Ouedrago R., Gandji T., Mpele P., Dibanga G., Koumare B., Saidou M., Esu-Williams E., Lombart J., Badombena W., Nkandu L., Vanden Haesevelde M., Delaporte E. Geographic distribution of HIV-1 group O viruses in Africa // AIDS. - 1997. - V. 11. - P. 493-498.

13. Zekeng L., Gurtler L., Afane Ze E., Sam-Abbenyi A., Mbouni-Essomba G., Mpoudi-Ngolle E., Monny-Lobe M., Tapka J.B., Kaptue L. Prevalence of HIV-1 subtype O infection in Cameroon: preliminary results // AIDS. - 1994. - V. 8. - P. 1626-1628.

14. Ayouba A., Souquieres S., Njinku B., Martin P.M., Muller-Trutwin M.C., Roques P., Barre-Sinoussi F., Mauclore P., Simon F., Nerrienet E. HIV-1 group N among HIV-1- seropositive individuals in Cameroon // AIDS. - 2000. - V. 14. - P. 2623-2625.

15. Simon F., Mauclore P., Roques P., Loussert-Ajaka I., Muller-Trutwin M.C., Saragosti S., Georges-Courbot M.C., Barre-Sinoussi F., Brun-Vezinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. Nat Med. - 1998. - V. 4. - P. 1032-1037.

16. Triques K., Bourgeois A., Vidal N., Mpoudi-Ngole E., Mulanga-Kabeya C., Nzilambi N., Torimiro N., Saman E., Delaporte E., Peeters M. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV type 1 subtype designated K // AIDS Res Hum Retroviruses. - 2000. - V. 16. - P. 139-151.

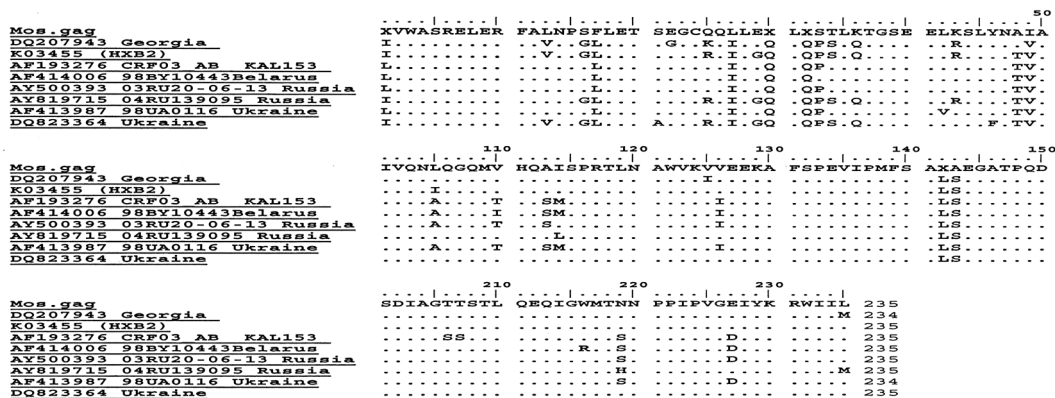
17. Gao F., Vidal N., Li Y., Trask S., Chen Y., Kostrikis L., Ho D., Oh M., Salminen M., Robertson D., Shaw G., Hahn B., Peeters M. Evidence for Two Distinct Sub-subtypes within the HIV-1 subtype A Radiation // AIDS Res Hum Retroviruses. - 2001 May 20. - V. 17(8). - P. 675-88.

18. Louwagie J., McCutchan F.E., Peeters M., Brennan T.P., Sanders-Buell E., Eddy G.A., van der Groen G., Franssen K., Gershon-Damet G.M., Deleys R. et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes // AIDS. - 1993. - V. 7. - P. 769-780.

19. Kostrikis L., Bagdades E., Cao Y., Zhang L., Dimitriou D., Ho D. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I // J Virol. - 1995. - V. 69. - P. 6122-6130.

20. Louwagie J., Janssens W., Mascola J., Heyndrickx L., Hegerich P., van der Groen G., McCutchan F.E., Burke D.S. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin // J Virol. - 1995. - V. 69. - P. 263-271.

21. Triques K., Bourgeois A., Saragosti S. et al. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa // Virology. - 1999. - V. 259. - P. 99-109.



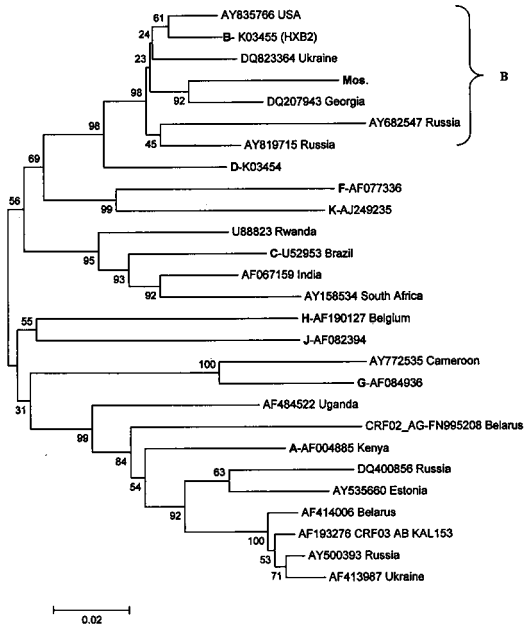
Фиг. 1

	10	20	30	40
Mos.pol	FFRENLAFCQ	REARKFSSEQ	TRAIADTRCX	LQVWRGDNNS
AF414006 98BY10443 Belarus
AY500393 OSRU20-06-13 Russia
AY819715 Russia
DQ207943 Georgia
98UA0116 Ukraine
AF193276 HVV-1 CRF03 AB KAL153
K03455 (HXB2)
DQ823364 Ukraine
	110	120	130	140
Mos.pol	FKMIGGICGP	IKVRQYDQVE	LEKCKKKAIC	TWLVGDFIVN
AF414006 98BY10443 Belarus
AY500393 OSRU20-06-13 Russia
AY819715 Russia
DQ207943 Georgia
98UA0116 Ukraine
AF193276 HVV-1 CRF03 AB KAL153
K03455 (HXB2)
DQ823364 Ukraine
	210	220	230	240
Mos.pol	OKIKIKTQEN	EYNTVEVFAIK	KKDSTKWAEL	VDFRELNKMT
AF414006 98BY10443 Belarus
AY500393 OSRU20-06-13 Russia
AY819715 Russia
DQ207943 Georgia
98UA0116 Ukraine
AF193276 HVV-1 CRF03 AB KAL153
K03455 (HXB2)
DQ823364 Ukraine
	310	320	330	340
Mos.pol	QYNVLPQGWK	GSPALFQSSM	TRILEPFAKC	NDEIVIKQSM
AF414006 98BY10443 Belarus
AY500393 OSRU20-06-13 Russia
AY819715 Russia
DQ207943 Georgia
98UA0116 Ukraine
AF193276 HVV-1 CRF03 AB KAL153
K03455 (HXB2)
DQ823364 Ukraine
	410	420	430	440
Mos.pol	MLPDKDSWTV	NDQKQLVGLL	NWASQIYDGI	KIKQLCKLLR
AF414006 98BY10443 Belarus
AY500393 OSRU20-06-13 Russia
AY819715 Russia
DQ207943 Georgia
98UA0116 Ukraine
AF193276 HVV-1 CRF03 AB KAL153
K03455 (HXB2)
DQ823364 Ukraine

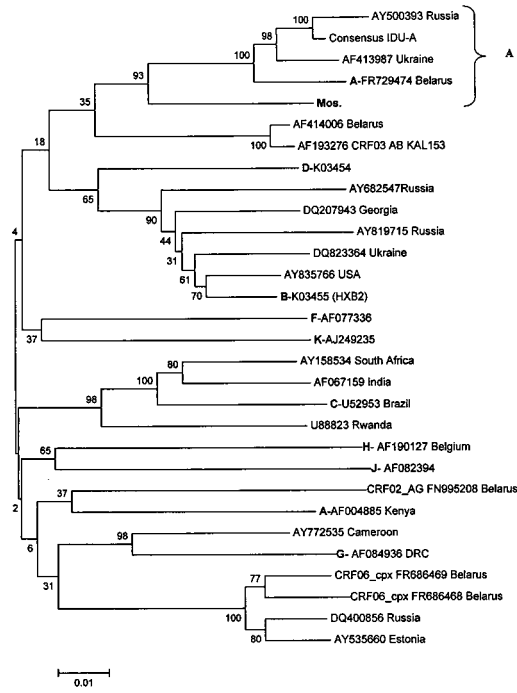
Фиг. 2

	10	20	30	40	50
Mos.env	IMRSENLELD	NTRKILIVQLN	QIVNITCIRP	NNNRTSIRK	XGPGQTFYA
AF414006 98BY10443 Belarus
AY500393 OSRU20-06-13 Russia
AF413987 98UA0116 Ukraine
AY619715 OSRU139095 Russia
AF193276 CRF03 AB KAL153
DQ823364 Ukraine
DQ207943
K03455 (HXB2)
AF413987 Ukraine

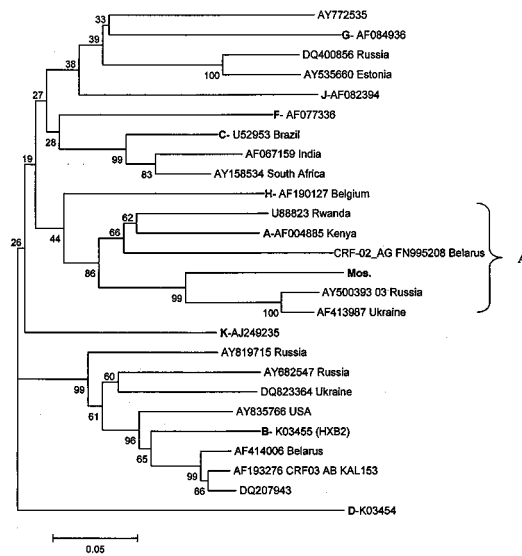
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6