

**HIV-1 VARIATION AND HLA CLASS I DIVERSITY:  
IMPACT ON VACCINE DESIGN**

**UNCHALEE VISAWAPOKA**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2006**

**ISBN 974-04-7680-5  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**ความหลากหลายของเชื้อ HIV-1 และ HLA Class I: ผลกระทบต่อการออกแบบวัคซีน (HIV-1 VARIATION AND HLA CLASS I DIVERSITY: IMPACT ON VACCINE DESIGN)**

อัญชลี วิศวโรคา 4336146 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D., FRANCINE E. McCUTCHAN Ph.D., อรุณี ธิติชัยญาณนท์, พ.บ.

**บทคัดย่อ**

การพัฒนาวัคซีนเอดส์ที่มีประสิทธิภาพสูงจะเป็นมาตรการสำคัญอันหนึ่งในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคเอดส์ โดยแนวทางการพัฒนาวัคซีนเอดส์ในปัจจุบันจะเป็นการมุ่งให้เกิดการกระตุ้น Cytotoxic T lymphocyte (CTL) ที่ออกฤทธิ์กว้าง แทนการกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี เนื่องจากรายงานผลการทดสอบวัคซีนเอดส์ในระยะที่ 3 ชนิดกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอดส์ได้

เพื่อตรวจสอบถึงผลกระทบของความซับซ้อนของสายพันธุ์เชื้อ HIV-1 ที่ระบาดและความสำคัญของสารพันธุกรรมของคนที่อยู่ในพื้นที่ จึงได้ทำการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของเชื้อ HIV-1 ในเคนยา โดยการตรวจสอบการกระจายของสายพันธุ์ของเชื้อ HIV-1 ในเลือดที่มีผลบวกต่อเชื้อ HIV-1 จำนวน 40 ราย ด้วยวิธี Nested PCR และการหาลำดับเบส จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยอาศัยลำดับเบสของส่วน *gag* และ *nef* พบว่า 94% เป็น subtype A และ A containing recombinant นอกจากนี้ยังได้ค้นพบ A2-containing CRF ชนิดใหม่ที่ชื่อว่า CRF21\_A2D จากการตรวจสอบโดยการทำ HLA class I genotyping ด้วยวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกสูงพบว่า HLA-A และ -B alleles ที่พบบ่อยในกลุ่มตัวอย่างคือ A6802, A0201, A0101 และ B5301, B1503, B4202

ในขณะเดียวกัน ได้ศึกษาการตอบสนองของ HIV-1 specific CD8 T-cell ด้วยวิธี IFN $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay โดยการใช้ overlapping peptide pools 4 กลุ่มที่มีการเรียงลำดับตาม subtype A consensus, isolated strains ของ A, C และ D ของโปรตีน Gag and 3 กลุ่มของ subtypes A, C และ D ของโปรตีน Nef. พบว่าลักษณะของ CTL recognition ต่อโปรตีน Gag และ Nef ในคนที่ติดเชื้อชนิด subtypes A มีลักษณะเหมือนกับคนที่ติดเชื้อชนิด subtypes B และ C โดยส่วนของโปรตีน p17 และ p24 ของ Gag และส่วนตอนกลางที่อนุรักษ์ของ Nef เป็นตำแหน่งที่มี epitopes อยู่เป็นจำนวนมาก จากการทดสอบโดยใช้ชุดของเปปไทด์ผสมที่มีการเรียงลำดับเหมือนกับ subtypes A, C และ D พบว่าชุดของเปปไทด์ที่มีชนิดเดียวกับ autologous infected subtype จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของตรวจสอบการตอบสนองของ CTL ได้เพียงเล็กน้อย แม้การตอบสนองโดยการใช้ชุดเปปไทด์ที่ต่างกันจะมีลักษณะเหมือนกัน แต่ในแต่ละชุดเปปไทด์จะสามารถตรวจพบการตอบสนองแบบเฉพาะที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยเปปไทด์ชุดอื่น แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของลำดับเบสของไวรัสใน subtypes ที่ต่างกัน มีผลต่อ CTL recognition. ซึ่งข้อสรุปนี้ยืนยันได้จากการศึกษาความเหมือนและความต่างของลำดับของกรดอะมิโนระหว่าง autologous infected HIV-1 sequence และลำดับของชุดเปปไทด์ที่ใช้ในการทดสอบการตอบสนองของ Cytotoxic T lymphocyte (CTL)

การศึกษากการตอบสนองแบบ Cumulative Elispot-based CTL ที่สามารถจับได้กับ HLA class I alleles หลายชนิด รวมทั้งข้อมูลที่แสดงความหลากหลายของลำดับเบส จะเป็นข้อมูลที่ช่วยแสดงลักษณะของตำแหน่งที่เป็น immunodominant ที่อยู่บน HIV-1 genome และเป็นประโยชน์ในการเลือก epitopes ที่สามารถครอบคลุมในกลุ่มประชากรต่างๆได้ ผลการศึกษานี้เสนอแนะว่า การใช้ poly-epitope subtype-specific HIV-1 ร่วมกับ multiple immunodominant CTL epitopes จาก HIV-1 subtypes ชนิดที่แพร่ระบาดอยู่ในพื้นที่ จะเป็นแนวทางที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการออกแบบวัคซีนเอดส์

## HIV-1 VARIATION AND HLA CLASS I DIVERSITY: IMPACT ON VACCINE DESIGN.

UNCHALEE VISAWAPOKA 4336146 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D.,  
FRANCINE E. McCUTCHAN, Ph.D., ARUNEE THITITHANYANONT, M.D.

### ABSTRACT

The development of a highly efficacious HIV/AIDS vaccine is a vital goal for global control of AIDS epidemics. It is currently accepted that the induction of high levels of broadly reactive cytotoxic T lymphocytes (CTL) is a promising approach for an effective HIV-1 vaccine since the antibody induction approach alone has been reported to lack protection in phase III vaccine trials.

To investigate the impact of genetic complexity of local circulating HIV-1 and the importance of host genetic background on vaccine design, a molecular epidemiological study of HIV-1 in Kenya was undertaken through the investigation of subtype distribution on forty discarded HIV sero-positive blood samples by nested PCR and sequencing. Similar to a previous report, sequence-based phylogenetic analysis of the entire *gag* and *nef* regions in forty samples revealed 94% subtype A and A-containing recombinants. In addition, a new A2-containing CRF named CRF21\_A2D was discovered in this cohort study. Determination of HLA class I genotyping by high resolution method showed that the most common HLA -A and -B alleles in these samples were A6802, A 0201, A 0101 and B 5301, B 1503, B 4202, respectively.

In a parallel study, peripheral blood mononuclear cells from forty samples were analyzed for their HIV-1 specific CD8 T-cell responses by IFN $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay using 4 overlapping peptide pools. These peptide pools were based on the sequence of subtype A consensus and isolated strains of A, C and D of Gag and 3 pools of subtypes A, C and D of Nef. The pattern of CTL recognition of Gag and Nef proteins in subtype A infection was similar to that seen in subtypes B and C with the p17 and p24 proteins of Gag and the central conserved of Nef were targeted with high density of defined epitopes. Screening of multiple peptide sets representing subtypes A, C and D revealed that the peptide sets based on the autologous infected subtype slightly improved the capacity to detect CTL response. Although similar numbers and patterns of responses were observed in different peptide sets, each set was capable of detecting the unique response that could not be identified by others indicating that the viral sequence variability between distinct subtypes may be involved in CTL recognition. This result was supported by an investigation of the influence of the matching and mismatching of amino acids between autologous infected HIV-1 sequence and the sequences of reagent peptide sets with cytotoxic T lymphocyte (CTL) response.

A comprehensive study of cumulative Elispot-based CTL responses that can bind multiple HLA class I alleles combined with diversity and sequence consensus data provide an additional characterization of immunodominant regions encompassing the HIV-1 genome. This should facilitate the selection of epitopes with an increase of population coverage. Our results suggest that the construction of a poly-epitope subtype-specific HIV-1 that includes multiple immunodominant CTL epitopes from circulating predominant HIV-1 subtypes might be a logical approach in the design of vaccine against AIDS.

KEY WORDS: HIV-1 / *gag* / *nef* / CRF21\_A2D / HLA / CTL EPITOPE

163 P. ISBN 974-04-7680-5