เชื้อเอชไอวีที่เป็นประชากรกลุ่มน้อยที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านไวรัสในกลุ่ม Reverse Transcriptase และ Integrase Inhibitiors และ GENETIC BARRIER สำหรับการพัฒนาของการดื้อต่อยาต้านไวรัสในกลุ่ม INTEGRASE INHIBITORS

นาย เหงียน เฮ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HIV-1 MINORITY VARIANTS ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE AND INTEGRASE INHIBITORS AND GENETIC BARRIER FOR THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO INTEGRASE INHIBITORS

Mr. Hai Le Nguyen

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2011
Copyright of Chulalongkorn University

541419

Thesis Title	HIV-1 minority variants associated with drug resistance of reverse transcriptase and integrase inhibitors and genetic barrier for the development of resistance to integrase inhibitors
By	Mr. Hai Le Nguyen
Field of Study	Biomedical Sciences
Thesis Advisor	Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.
Thesis Co- Advisor	Associate Professor Constance Delaugerre, Pharm.D., Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.... Chairman
(Associate Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.)

.... Thesis Advisor
(Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Constance Delaugerre, Pharm.D., Ph.D.)

.... Examiner
(Assistant Professor Sunchai Payungporn, Ph.D.)

..... Examiner
(Chutitorn Ketloy, Ph.D.)

..... External Examiner
(Anchalee Avihingsanon,M.D.)

เหงียน เฮ: เชื้อเอชไอวีที่เป็นประชากรกลุ่มน้อยที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านไวรัสในกลุ่ม REVERSE TRANSCRIPTASE และ INTEGRASE INHIBITIORS และ GENETIC BARRIER สำหรับการพัฒนาของการดื้อต่อยาต้านไวรัสในกลุ่ม INTEGRASE INHIBITORS. อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ASSOC.PROF. CONSTANCE DELLAUGERRE., 108 หน้า.

การตรวจหาเชื้อเอชไอวีที่ดื้อยาด้วยวิธีตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบมาตรฐาน SEQUENCING-BASED TEST นั้นไม่สามารถตรวจหาเชื้อดื้อที่มีน้อยกว่าร้อยละ 20 ได้ จึงได้ทำการศึกษาความชุกของเชื้อเอชไอวีที่เป็นประชากรส่วนน้อยที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสเอชไอวี (MINORITY RESISTANCE) ในกลุ่ม REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR จากตัวอย่างผู้ป่วยสองกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยชายรักชายที่เพิ่งติดเชื้อและยังไม่ได้รับยาต้านไวรัสและไม่พบเชื้อดื้อยาจากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบมาตรฐาน จำนวน 104 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่การรักษาโดยยาต้านไวรัสสูตรแรกที่เป็น NNRTI-BASED ล้มเหลว จำนวน 22 ราย ได้พัฒนาการตรวจโดยใช้วิธี PYROSEQUENCING เพื่อตรวจหาเชื้อดื้อยาที่ตำแหน่ง Y181C และ M184V โดยมีความไวของการตรวจที่ประมาณ 1% ผลการวิจัยพบว่า กลุ่มตัวอย่างชายรักชายที่เพิ่งติดเชื้อพบความชุกของเชื้อเอชไอวีที่เป็นประชากรกลุ่มน้อยที่ตำแหน่ง Y181C ประมาณ 0.96% (1/104) และที่ตำแหน่ง M184V ประมาณ 3% (3/101) สำหรับกลุ่มผู้ป่วยที่การรักษาโดยยาต้านไวรัสสูตรแรกที่เป็น NNRTI-BASED ล้มเหลว พบว่ามีความชุกของเชื้อเอชไอวีที่ตำแหน่ง M184V ประมาณ 4.5%

เพื่อศึกษากลไกของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N155H ต่อการดื้อยาในกลุ่ม INTEGRASE INHIBITOR เช่น RALTEGRAVIR (RAL) ได้ใช้การตรวจด้วยเทคนิค ALLELE SPECIFIC PCR (AS-PCR, ซึ่งสามารถตรวจ N155H ที่มีอยู่อย่างน้อย 0.1% ได้)ในเตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีประวัติล้มเหลวต่อยาต้านไวรัสมาหลายชนิดและล้มเหลวต่อยา RAL ด้วยจำนวน 5 ราย ซึ่งมีการดื้อยาใน 3 รูปแบบ ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดทั้งที่เก็บก่อนได้ยา RAL และหลังหยุดยา RAL ไม่พบว่ามีประชากรส่วนน้อยของการกลายพันธุ์ที่ N155H ในผู้ป่วย 3 รายที่ตรวจพบ N155H ในระดับต่างกันตั้งแต่แรก พบว่ามี 1 รายที่มี N155H ลดลงเมื่อเริ่มตรวจพบ Q148H และ G140S ส่วนในผู้ป่วย 2 รายที่ตรวจพบการกลายที่ตำแหน่ง Q148H ตั้งแต่ต้นจะตรวจไม่พบ N155H ทั้งในตัวอย่างอาร์เอนเอและดีเอ็นเอ แสดงว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N155H ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยา

การวิจัยเรื่องสุดท้ายคือ ความยากหรือง่ายต่อการดื้อยา (GENETIC BARRIERS) ในกลุ่ม INTEGRASE INHIBITORS (INIS) ซึ่งได้แก่ RALTEGRAVIR (RAL), EVITEGRAVIR (EVG) และ DOLUTEGRAVIR (DTG) ของเชื้อเอชไอวี สายพันธุ์ CRF01_AE ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และสายพันธุ์ B ซึ่งพบมากในประเทศพัฒนาแล้ว ผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์โดยเปรียบเทียบการแทนที่ 66 ครั้งที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา INI ในกรดอะมิโน 41 ตำแหน่ง จากผู้ป่วย 144 รายที่ไม่เคยรับยาต้าน INI มาก่อน (109 ติดเชื้อสายพันธุ์ CRF01_AE และ 35 รายติดเชื้อสายพันธุ์ B) ที่กรดอะมิโนที่มีการกลายพันธุ์ 6 ตำแหน่ง ได้แก่ V72I L101I A124T T125K G140C/S และ V201I พบว่า โอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G140C/S เกิดยากกว่า และที่ V201I เกิดง่ายกว่า ใน สายพันธุ์ CRF01_AE เมื่อเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ B อย่างไรก็ตาม โอกาสการเกิดกลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิต่อยา RAL และ EVG ไม่แตกต่างกันระหว่างเชื้อสองสายพันธุ์ แต่พบความแตกต่างต่อการดื้อยา DTG ที่ตำแหน่ง L101I และ A124T และยังเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ในระดับรองต่อการดื้อยา RAL และ EVG ที่ตำแหน่ง V72I T125K G140C/S และ V201I ด้วย

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

#5187846520 : MAJOR BIOMEDICAL SCIENCES
KEYWORDS : HIV-1/ MINORITY DRUG RESISTANCE/ GENETIC BARRIER

HAI LE NGUYEN: HIV-1 MINORITY VARIANTS ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE AND INTEGRASE INHIBITORS AND GENETIC BARRIER FOR THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO INTEGRASE INHIBITORS. ADVISOR: PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. CONSTANCE DELLAUGERRE., 108 pp.

Minority HIV-1 drug resistance has not been studied in Thailand. Two groups of patients, whose conventional genotyping results showed no drug resistance-associated mutations, were investigated: 104 homosexual men recently infected with HIV-1, naïve to antiretroviral treatment and 22 first-line NNRTI-based failures. Pyrosequencing assay was developed to detect and quantify minority Y181C and M184V variants from the patients' plasma samples. 1/104 (0.96%) and 3/101 (3%) samples were found harboring Y181C and M184V in the group of homosexual men. In patients with first-line treatment failure, one harbored minority M184V mutants (4.5%). Thus, due to such a low prevalence, minority drug resistance test may not be cost-effective for implementing in Thailand.

The mechanism of raltegravir (RAL)-resistant evolutions has not been completely elucidated. Because of the emergence of RAL resistance usually initiated with the N155H mutant, we assessed the role of minority N155H-mutated variants in circulating RNA and archived DNA in 5 heavily treated patients experiencing RAL failure and harboring 3 different resistance profiles. No minority N155H-mutated variant was found by allele specific PCR (AS-PCR) in both plasma and whole blood samples collected at baseline and after RAL withdrawal in all 5 patients. During RAL failure, the mutation N155H was detected at different levels in 3 patients displaying the N155H pathway and gradually declined when the double mutant Q148H+G140S was selected in one patient. In two patients with the Q148H resistance pathway, no N155H variant was identified by AS-PCR in both viral RNA and DNA. The N155H mutants do not play a role in determining different resistance profiles.

The genetic barrier for the evolution of integrase inhibitors (INIs) including RAL, elvitegravir (EVG), and dolutegravir (DTG) resistance was compared between HIV-1 subtypes B and CRF01_AE by analyzing of 66 substitutions associated with INI resistance at 41 amino acid positions in 144 nucleotide sequences (109 HIV-1 subtype CRF01_AE and 35 HIV-1 subtype B) of IN gene derived from INI-naïve patients. Most studied amino acid positions including all corresponding to RAL and EVG primary mutations show a high degree of conservation, indicating the same genetic barrier between subtypes CRF01_AE and B. Nevertheless, different genetic barriers were observed in two mutations described to be associated with DTG resistance (L101I, A124T) and other five RAL and EVG secondary mutations (V72I, T125K, G140C/S, V201I), which could have an impact on the development of resistance to RAL, EVG, and DTG.

Field of Study: Biomedical Sciences

Academic Year: 2011

Student's Signature:.....

Advisor's Signature:.....

Co-Advisor's Signature:.....

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis is the report of all my work done during my journey to achieve a dual diploma from Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand) and Université Paris Diderot - Paris 7 (Paris, France). I would like to express my gratitude to all people who have supported me along the way to the final.

Firstly, I would like to extent my sincere gratitude and deep appreciation to my advisors Professor Kiat Ruxrungtham, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Associate Professor Constance Delaugerre, Hôpital Saint-Louis, Université Paris Diderot - Paris 7 for their kind supervision, valuable advice, and constructive guidance throughout my study no matter how busy they are. I would like to give special thanks to Dr.Sunee Sirivichayakul, Supranee Buranapraditkun, Assoc.Prof.Alain Jacquet, Patrawadee Pitakpolrat, Suwanna Mekprasan, Pinya Pulsawa, Eakachai Prompetchara, June Ohata at Vaccine and Cellular Immunology Laboratory (VCI Lab), Chulalongkorn Medical Research Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and HIV-NAT for being friendly and helpful during my time in Bangkok, Thailand. I sincerely appreciate Prof. François Simon, Dr. Jerôme Le Goff, Severine Mercier-Delarue, Nga Nguyen at Virology Departments, Hôpital Saint-Louis for their helps and supports during my time in Hôpital Saint-Louis, Paris, France. My thanks also go to Prof. François Clavel, Prof. Allan Hance and PhD students and postdoc Emilie Battivelli, Blandine Monel, Junko Shibata at INSERM U941- Université Paris Diderot - Paris 7.

I am also thankful to Dr. Marie-Laure Chaix, CHU Necker-Enfants Malades, Université René Descartes, Paris V, France and Dr. Anchalee Avihingsanon, HIV-NAT, Bangkok, Thailand for kind acceptance to be external members and rapporteurs of my thesis jury.

My special appreciation is sent to Assoc. Prof. Nguyen Tran Hien, Director of the National Institute of Hygiene for your kind support and encouragement. I also would like to gratefully thank Dr. Nguyen Anh Tuan, Head of HIV/AIDS department and all my colleagues at the department for valuable supports.

I gratefully acknowledge the Joint TICA-TRF-French Embassy fellowship program for providing me a scholarship supporting my study in Thailand and France.

Thank you very much my Vietnamese friends in Bangkok, Thailand and Paris, France for your friendship, sharing, encouraging and supports.

Last but not least, I am definitely indebted my family, my wife Bui Thi Mai Huong and two wonderful dearest children BiBi-Nguyen Phuong Mai and BuBu-Nguyen Nhat Khoi Nguyen. Your understanding, encouragement, and joyfulness motivated me to overcome many difficulties during my time far away from our lovely home. Huong, keep doing harder you can achieve Ph.D from Copenhagen University, Denmark quickly within this year. I would like to take this opportunity to express my profound gratitude to my beloved parents, my sisters and especially my mother in law who helped continuously and considerately my small family when I have been away from the country. Again, thank you very much.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) IV

ABSTRACT (ENGLISH) V

ACKNOWLEDGEMENTS VI

CONTENTS VII

LIST OF TABLES X

LIST OF FIGURES XI

LIST OF ABBREVIATIONS XIII

CHAPTER I INTRODUCTION 1

1.1. Background and rationale 1

1.1.1. Minority HIV-1 drug resistance 1

1.1.2. HIV-1 minority resistant variants have not been studied yet in Thailand 3

1.1.3. Minority N155H mutation in patients failing raltegravir-containing regimen in France 5

1.1.4. Genetic barrier to the development of resistance to integrase inhibitors in HIV-1 subtypes CRF01_AE and B 6

1.2. Studies of the thesis 8

1.3. Objectives 8

1.4. Key words 9

1.5. Expected benefits 9

CHAPTER II LITERATURE REVIEW 10

2.1. Discovery of Human Immunodefiency Virus 10

2.2. Natural progression of HIV infection 10

2.2.1. Acute seroconversion 11

2.2.2. Asymtomatic infection 11

2.2.3. AIDS 12

2.3. HIV genotype classification and global distribution of HIV epidemic 12

2.4. HIV structure 15

2.5. HIV replication cycle 17

2.5.1. HIV entry 18

Page

2.5.2. Reverse transcription 18
2.5.3. Integration 19
2.5.4. Transcription and protein synthesis 19
2.5.5. Viral budding and maturation 19
2.6. Antiretroviral therapy 20
2.6.1. Mechanisms of actions 20
2.6.2. HIV drug resistance 23
2.7. Genetic barrier to develop drug resistance 36
2.8. Minority drug resistance 37
2.9. Standard assays to identify drug resistance 41
2.9.1. Phenotypic assay 42
2.9.2. Genotypic assay 43
2.10. Laboratory technology to identify minority drug resistant variants 44
2.10.1. Standard cloning and direct sequencing of multiple clones 44
2.10.2. Single genome sequencing 45
2.10.3. Heteroduplex tracking assay (HTA) 47
2.10.4. Line probe assay (LiPA) 47
2.10.5. Oligonucleotide ligase-based assay (OLA) 48
2.10.6. Allele specific real time PCR (AS-PCR) 48
2.10.7. Ultra-deep sequencing 49
2.10.8. Pyrosequencing 50

CHAPTER III METHODS AND STUDY POPULATIONS 52

3.1. Study samples in Thailand 52
3.2. Pyrosequencing assay 53
3.3. Patients and methods for longitudinal analysis of minority N155H mutation in France 54
3.4. Samples and methods for analysis of genetic barrier to the development of resistance to INIs in HIV-1 subtypes CRF01_AE and B 56

CHAPTER IV RESULTS 58

4.1. Pyrosequencing validation 58
4.2. Minority Y181C and M184V variants in people recently infected with HIV-1 and naïve to antiretroviral treatment 60
4.3. Minority Y181C and M184V variants in patients who experienced first-line antiretroviral treatment failure 61

Page

4.4. Minority N155H drug resistance in circulating RNA and archived proviral DNA in heavily treated patients with raltegravir-based salvage failure 63

4.5. Genetic barrier to the development of resistance to INIs in HIV-1 subtypes B and CRF01_AE 67

CHAPTER V DISCUSSION AND CONCLUSIONS 73

5.1. Minority Y181C and M184V mutants in patients recently infected with HIV-1 and those with first-line failure to ARV in Thailand (paper 1) 73

5.2. Minority N155H drug resistance has no association with different RAL resistant profiles (paper 2) 77

5.3. Genetic barrier to the development of integrase inhibitor resistance is generally similar between HIV-1 subtype B and CRF01_AE (paper 3) 79

5.4. General discussion and conclusion 83

5.4.1. Technical issues of assays for minority species detection 83

5.4.2. Prevalence and clinical relevance of minority variants 85

REFERENCES 86

BIOGRAPHY 108

LIST OF TABLES

Page

Table 1. Antiretroviral drugs used in treatment of HIV infection approved by U.S. Food and Drug Administration by 2011 21

Table 2. Cross resistance between RAL and EVG 36

Table 3. Advantages and disadvantages of phenotyping and genotyping 41

Table 4. Techniques to detect and quantify minority quasispecies of HIV-1 drug resistance 46

Table 5. Demographic characteristics of 104 Thai homosexual men recently infected with HIV-1 and naïve to antiretroviral treatment from cohort of TASER-S with no Y181C and M184V mutations found by conventional genotyping 60

Table 6. Characteristics of 22 Thai patients infected with HIV-1 who failed first-line antiretroviral therapy with no Y181C and M184V mutations found by conventional genotyping at time of failure 61

Table 7. Therapeutic and resistance characteristics of 5 heavily treated patients failing raltegravir salvage therapy 66

Table 8. Codon frequency and calculated genetic barrier corresponding to each codon in 66 mutations associated with raltegravir, elvitegravir, and dolutegravir resistance at 41 amino acid positions in integrase gene in HIV-1 subtypes B and CRF01_AE. 69

Table 9. Minimum HIV-1 RNA load required to detect minority variants at frequencies of 0.1%, 1%, and 10%, assuming that the RNA is extracted from 1ml of plasma 84

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1. Natural progression of HIV infection. 11

Figure 2. Phylogenetic tree of HIV-1 groups and subtypes. 12

Figure 3. Classification of HIV genotypes and their origins. 13

Figure 4. Global distribution of HIV-1 subtypes. 14

Figure 5. Structure of an HIV virion. 16

Figure 6. HIV genome. 17

Figure 7. HIV replication cycle. 18

Figure 8. The two principal mechanisms of resistance of HIV to nucleoside analogues. 26

Figure 9. Mechanism of resistance of HIV to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. 28

Figure 10. Mutations associated with all available ARV drugs 33

Figure 11. HIV-1 infection and a model of the distribution of viral quasispecies under HAART 39

Figure 12. Calculation of fold change. 42

Figure 13. Principle and chemistry of pyrosequencing. 51

Figure 14. Primers for pyrosequencing assays. 54

Figure 15. Pyrosequencing assay on plasmids. 59

Figure 16. Proportions of patients with neither M184V nor Y181C found by conventional genotyping harbored M184V and/or Y181C minority strains in their plasma 62

Page

Figure 17. Raltegravir resistance patterns in 5 patients failing raltegravir salvage therapy. 65

Figure 18. Comparison of genetic barriers for the development of mutations related to raltegravir, elvitegravir, and dolutegravir between HIV-1 subtype CRF01_AE and subtype B. 71

LIST OF ABBREVIATIONS

3TC	=	lamivudine
Ab	=	antibody
ABC	=	abacavir
Ag	=	antigen
AIDS	=	acquired immune deficiency syndrome
ANRS	=	agence nationale de la recherche sur le SIDA
ART	=	antiretroviral therapy
ARV	=	antiretroviral
AS-PCR	=	allele specific polymerase chain reaction
ATV	=	atazanavir
AZT	=	zidovudine
CRFs	=	circulating recombinant forms
d4T	=	stavudine
ddI	=	didanosine
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleoside triphosphate
DRV	=	darunavir
DRAM	=	drug resistance- associated mutation
DTG	=	dolutegravir
EFV	=	efavirenz
ENF	=	enfuvirtide
env	=	envelope
EVG	=	elvitegravir
FDA	=	food and drug administration (USA)
FC	=	fold-change
FTC	=	emtricitabine
gag	=	group specific antigen
gp	=	glycoprotein
GPO	=	Thai Government Pharmaceutical Organization
HAART	=	highly active antiretroviral therapy
HIV	=	human immunodeficiency virus
HIVDR	=	HIV drug resistance
IC_{50}	=	50% inhibitory concentration
IDV	=	indinavir
IN	=	integrase
INI	=	integrase inhibitor
kb	=	kilobases
LPV	=	lopinavir
LTR	=	long terminal repeat
MA	=	matrix proteins
PMTCT	=	prevention of mother to child transmission
MVC	=	maraviroc
NC	=	nucleocapsid
Nef	=	negative factor
NFV	=	nelfinavir
NNRTIs	=	non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NRTIs	=	nucleotide/nucleoside reverse transcriptase inhibitors

NVP	=	nevirapine
PIC	=	pre integration complex
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
PIs	=	protease inhibitors
Pol	=	polymerase
PR	=	protease
PCP	=	*Pneumocystis carnii pneumonia*
PSQ	=	pyrosequencing
PIC	=	pre-integration complex
PLWH	=	people living with HIV/AIDS
RAL	=	raltegravir
RCT	=	reverse transcription complex
Rev	=	regulator of viral protein synthesis
RNA	=	ribonucleic acid
RT	=	reverse transcriptase
RTC	=	reverse transcription complex
RTV	=	ritonavir
SU	=	surface unit
SQV	=	saquinavir
Tat	=	transcriptional transactivator
TAM	=	thymidine- analogue resistance mutations
TDF	=	tenofovir
TDR	=	transmitted drug resistance
TM	=	transmembrane unit
TPV	=	tipranavir
Vif	=	virion infectivity factor
Vpr	=	viral protein R
Vpu	=	viral protein U
WT	=	wild-type
WHO	=	World Health Organization