รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: **การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอวัคซีนของไวรัสเอชไอวีที่เป็นสายพันธุ์เอเชียลูกผสมระหว่างสับไทป์เออีและสับไทป์บีในส่วนของ gag/pol/env รวมกันเทียบกับดีเอ็นเอวัคซีนที่มี env อย่างเดียวในหนู BALB/c**

Env-specific immunogenicity of Asian mosaic HIV-1 subtype AE/B gag/pol/env combination and HIV-1 env alone DNA vaccine in BALB/c mice

คณะผู้วิจัย

ดร.สุณี ศิริวิชยกุล[1]

ดร.สุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล[1]

นายภัทรวัจน์ ตันติวรสิทธิ์[1]

Margherita Rosati[2]

Barbara K Felber[2]

นางสาวภัทราวดี พิทักษ์พลรัตน์[1]

Bette Korber[3]

ศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม[1]

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2]Human Retrovirus Pathogenesis Section, Vaccine Branch, Center for Cancer Research, Frederick, MD 21702, USA

[3]Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, USA

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2555

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: **การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอวัคซีนของไวรัสเอชไอวีที่เป็นสายพันธุ์เอเชียลูกผสมระหว่างสับไทป์เออีและสับไทป์บีในส่วนของ gag/pol/env รวมกันเทียบกับดีเอ็นเอวัคซีนที่มี env อย่างเดียวในหนู BALB/c**

Env-specific immunogenicity of Asian mosaic HIV-1 subtype AE/B gag/pol/env combination and HIV-1 env alone DNA vaccine in BALB/c mice

คณะผู้วิจัย

ดร.สุณี ศิริวิชยกุล[1]

ดร.สุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล[1]

นายภัทรวัจน์ ตันติวรสิทธิ์[1]

Margherita Rosati[2]

Barbara K Felber[2]

นางสาวภัทราวดี พิทักษ์พลรัตน์[1]

Bette Korber[3]

ศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม[1]

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2]Human Retrovirus Pathogenesis Section, Vaccine Branch, Center for Cancer Research, Frederick, MD 21702, USA

[3]Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, USA

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์กิตติคุณนายแพทย์ประพันธ์ ภานุภาค ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆ ในโครงการวิจัยนี้

ภาควิชาอายุรศาสตร์ และ Chula-MRC คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2555

ดร.สุณี ศิริวิชยกุล และคณะ

บทคัดย่อ

ในความพยายามที่จะเอาชนะความหลากหลายทางพันธุกรรมของไวรัสเอชไอวี 1 ที่ระบาดในประเทศแถบเอเชีย คณะผู้วิจัยได้เตรียมวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็นสายพันธุ์เอเชียลูกผสมระหว่างสับไทป์เออีและสับไทป์บีในส่วนของ gag (ส่วนแกนกลาง), ส่วน pol (ส่วนที่เป็นเอ็นไซม์) และ/env (ส่วนเปลือกนอก) โดยนำลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมที่ได้จากไวรัสที่พบในประเทศแถบเอเชียมาผสมรวมกันและเลือกตัวแทนมาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ จากนั้นจึงสร้างวัคซีนชนิดดีเอ็นโดยการตัดต่อยีนในส่วน gag, pol และ env เข้าสู่ตัวพา (vector) แล้วทดสอบความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีนชนิดดีเอ็นเอนี้ในหนู BALB/c โดยวิธีการฉีดเข้ากล้ามและตามด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (electroporation) โดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น env อย่างเดียว และกลุ่มที่ 2 ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกัน จากนั้นวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์จากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกจากม้ามของหนู (splenocytes) โดยวิธี IFN-gamma ELISpot โดยการกระตุ้น splenocytes ด้วยเปปไทด์ที่เตรียมจากไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์เออีและสายพันธุ์บีแยกกันในหลอดทดลอง พบว่าในกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น env อย่างเดียว มีค่ามัธยฐานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเท่ากับ 1088 และ 680 SFU/10^6 splenocytes (spot forming unit/10^6 splenocytes) หลังจากกระตุ้นด้วยเปปไทด์ที่เตรียมจากไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์เออีและสายพันธุ์บีตามลำดับ เมื่อเทียบกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเท่ากับ 81 และ 18 SFU/10^6 splenocytes ในหนูกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกัน อย่างไรก็ตาม การฉีดกระตุ้นด้วย env-recombinant vaccinia virus ในกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น env อย่างเดียว หรือ gag/pol/env recombinant virus ในกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกัน สามารถเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเป็น 2012 และ 1550 ในกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น env อย่างเดียว และ 1833 และ 1285 SFU/10^6 splenocytes ในกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกัน แสดงว่าวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็นสายพันธุ์เอเชียลูกผสมระหว่างสับไทป์เออีและสับไทป์บีที่เป็น env อย่างเดียว สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ได้ดีกว่าวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกันเพราะมีปริมาณแอนติเจนมากกว่า ซึ่งการฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอและตามด้วยการฉีดกระตุ้นด้วย recombinant vaccinia virus มีประสิทธิภาพในการเสริมภูมิคุ้มกัน

เลขหมู่
เลขทะเบียน 018113
วัน. เดือน. ปี 6 ก.พ. 62

Abstract

To overcome the genetic diversity of HIV-1 among Asian countries, mosaic design of HIV-1 DNA vaccines encompassing gag, pol and env regions derived from HIV-1 CRF01_AE and Asian subtype B were constructed. Full-length gag, pol and env sequences were computerized to generate Asian mosaic HIV-1 gag/pol/env DNA. The immunogenicity of the Asian mosaic DNA were tested in BALB/c mice by electroporation. Cellular immune responses were measured from splenocytes by IFN-gamma ELISpot assay by both HIV-1 AE and B pooled truncated peptides. The median ELISpot responses to env AE and B peptides of the Asian mosaic HIV-1 env alone group were 1088 and 680 SFU/million splenocytes respectively as compared to 81 and 18 in the gag/pol/env combination. Boosting with recombinant env-vaccinia alone or recombinant gag/pol/env significantly enhanced ($p = 0.002$) the responses to 2012 and 1550 and 1833 and 1285 SFU/million splenocytes against AE and B pooled peptides, respectively. Our results suggest that the Asian mosaic env HIV-1 DNA vaccine was more immunogenic when immunized alone at high dose. The DNA priming effect of both groups was effective when boosted with recombinant AE-vaccinia.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ---------- I

Abstract (ไทย) ---------- II

Abstract (English) ---------- III

บทนำ ---------- 1

เนื้อเรื่อง ---------- 1

วิธีการดำเนินการวิจัย ---------- 1

ผลการศึกษาวิจัย ---------- 4

วิจารณ์ผลการทดลอง ---------- 9

บรรณานุกรม ---------- 11

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด ---------- 14

สารบัญรูปภาพ (List of Illustration)

หน้า

ภาพที่ 1. ค่ามัธยฐานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหนูที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น env อย่างเดียว และวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกัน และกระตุ้นด้วยเปปไทด์ที่เตรียมจากไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์เออี.....6

ภาพที่ 2. ค่ามัธยฐานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของหนูที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น env อย่างเดียว และวัคซีนชนิดดีเอ็นเอที่เป็น gag/pol/env รวมกัน และกระตุ้นด้วยเปปไทด์ที่เตรียมจากไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์บี.....8

List of Abbreviations

HIV	: Human Immunodeficiency Virus
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
Gag	: core antigen
Pol	: polymerase
Env	: envelope
CRF	: Circulating Recombinant Form
Kb	: kilobase
ECL	: electrochemiluminescent
µg	: microgram
µl	: microlitre
pfu	: plaque forming unit
rVV	: recombinant vaccinia virus
IFN-γ	: interferon gamma
RPMI	: Rosewell Park Memorial Institute
OLP	: overlapping peptides
NIH	: National Institute of Health
PBS	: Phosphate Buffer Saline
ELISpot	: Enzyme-linked immunospot assay
SFU	: spot forming unit

1. Introduction

Like any other infectious diseases, great expectation for an effective preventive vaccine was generated once the human immunodeficiency virus (HIV) was discovered as the causative agent of acquired immunodeficiency diseases (AIDS) in 1983 [1-3]. However, no successful HIV vaccine has been generated in spite of many efforts during the last three decades [4-12]. The only successful human trial of HIV vaccine so far was the RV144 study (canarypox vector vaccine: ALVAC-HIV, vCP1521 priming plus the gp120 AIDSVAX B/E vaccine boosting) with an efficacy of only 31.2 % [13]. Genetic diversity of HIV-1 and the lack of protective immune correlates in HIV infection are the two major obstacles for HIV vaccine development [4,14-16]. One of the attempts to overcome the genetic diversity of HIV-1 is the construction of a mosaic model that will be able to cover as many genetic diversities as possiblen[17-20]. Here, we report the immunogenicity of the Asian mosaic HIV-1 subtype AE/B consisting of *gag, pol, env* combination or *env* alone in BALB/c mice.

2. Materials and Methods

2.1 Computational design of Asian AE/B vaccines

Considering co-circulating subtypes and the possibility of new B/CRF01 recombination, vaccine candidates were designed by optimizing 1.5 kb full-length mosaic gag, 3.5 kb full-length mosaic pol and 2.7 kb full-length env sequences based on alignments including all Asian B, CRF01_AE and B/CRF01 recombinant sequences (156 CRF01_AE and 72 Asian HIV-1 subtype B for gag, 76 CRF01_AE and 30 Asian subtype B for pol, 113 CRF01_AE and 59 Asian HIV-1 subtype B for env) in the Los Alamos HIV database (until September 2007 for gag and pol and until September 2011 for env). The combination of B and CRF01_AE sequences into the design allows the vaccine to cover all potential B/CRF01_AE recombinants that may arise in

Thailand. The Mosaic Vaccine Tool Suite at http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/MOSAIC/ was used to optimize all the mosaic sequences [17]. The resulting 3 each of Asian AE/B mosaic gag , pol and env were used for DNA construction and immunization.

2.2 HIV gag, pol, env sequence construction and in vitro protein expression

The 3 Asian AE/B mosaic gag, pol and env genes were optimized and cloned into pCMVkan expression vector (CMVHIV Gag3.1, 3.2 and 3.3; CMVHIV pol 3.1, 3.2 and 3.3; and CMVHIV env 1, 2 and 3). The *in vitro* protein expression of each constructs were conducted by transfecting 0.1 μg of the DNA construct in 293T cells. After 48 hours, the cells and supernatants were harvested and analyzed by western blot using 12 % NuPAGE Bis-Tris Gel (Invitrogen) and ECL plus kit (GE Healthcare) for detection.

2.3 In vivo immunogenicity testing

The immunogenicity were tested in BALB/c mice. Six to eight-week female BALB/c mice were immunized by intramuscular (IM) followed by *in vivo* electroporation (EP) using 100 μg DNA at the 1st dose and 20 μg DNA at the 2nd and 3rd doses (mosaic env 1+2+3 in env DNA alone and mosaic gag/pol/env combination groups). The vaccinations were performed on days 0, 14 and 28 for DNA alone group. The mosaic env DNA (mosaic env 1+2+3) prime/vaccinia boost (with recombinant vaccinia-AE or B, mosaic env 1+2+3/vEnv E boosted and mosaic env 1+2+3/vEnv B boosted) strategy were also tested by boosting with 5-million pfu vaccinia-AE or vaccinia-B (NIH catalog# 4012, reagent vT176 for vaccinia-AE and NIH catalog# 3538, reagent vT1174 for vaccinia-B) on day 42. For the mosaic gag/pol/env, 4-million pfu of individual recombinant vaccinia HIV-AE gag, pol and env (NIH catalog# 3667, reagent vT142 for gag, NIH catalog#

3895, reagent vT143 for pol and NIH catalog# 4012, reagent vT176 for envAE), resulting as 12-million pfu were used for boosted dose in the DNA prime/vaccinia boost group (mosaic gag/pol/env/v_boosted). Altogether, 5 groups of mice, N = 6 per group, were immunized with mosaic env 1+2+3, mosaic env 1+2+3/vEnv E boosted, mosaic env 1+2+3/vEnv B boosted, mosaic gag/pol/env and mosaic gag/pol/env/v_boosted. Both HIV-1 AE- and B- env peptide pools were separately used to stimulate splenocytes. Two groups of 5 mice per group were intradermally immunized 3 times at 2-week interval with 5-million pfu recombinant vaccinia-AE (rVV_AE) or B (rVV_B) to serve as positive controls.

2.4 ELISpot assay for HIV-specific T cell responses

The ELISpot assay was performed by using mouse interferon-gamma (IFN-γ) kit (Mabtech, Stockholm, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 96-well ELISpot plates were coated with 50 μL/well of 10 μg/ml of anti-mouse IFN-γ monoclonal antibody (mAb) (AN18, Mabtech, Stockholm, Sweden) in PBS and incubated at 4°C over night. The plates were washed and blocked with R10 medium (RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum). $5x10^5$ isolated splenocytes per well were stimulated in duplicates with HIV-1 AE env pooled peptide (164 synthetic overlapping peptides (OLPs), 15 amino acid long overlapping by 11, AusPep, Melbourne, Victoria, Australia) [21] or HIV-1 B env pooled peptide (211 OLPs, 15 amino acid long overlapping by 11, NIH AIDS Reagent Program, catalog# 9480) or cultured in medium alone for 16 hours at 37°C with 5% CO_2. Concanavalin A (Con A) at 2.5 μg/ml was used as positive control. After incubation, the plates were washed 6 times with 200 μl/well of PBS/0.05% Tween20 followed by 1 time with PBS. Then 1 μg/mL of biotinylated monoclonal antibody to IFN-γ (R4-6A2-Biotin; Mabtech, Stockholm, Sweden) was added and were further incubated for 3 hours. The plates were washed again and 1:1,000 dilution in PBS of streptavidin alkaline

phosphatase (Mabtech, Stockholm, Sweden) was added and incubated for 1 hour. After another wash, alkaline phosphatase conjugate substrate kit (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate and nitro blue tetrazolium, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) was added for 30 minutes. The number of specific IFN-γ secreting T-cells were counted using an automated ELISpot reader (Carl Zeiss, Germany) and expressed as spot-forming units (SFU) per 10^6 splenocytes.

3. Results

3.1 Asian mosaic AE/B gag, pol and env constructs

From 156 CRF01_AE and 72 Asian HIV-1 subtype B for gag, 76 CRF01_AE and 30 Asian HIV-1 subtype B for pol, 113 CRF01_AE and 59 Asian HIV-1 subtype B for env, 3 Asian mosaic HIV-1 subtype AE/B sequences were generated for individual genes, namely CMVHIV Gag3.1, 3.2 and 3.3; CMVHIV pol 3.1, 3.2 and 3.3; and CMVHIV env 1, 2 and 3, respectively, resulting as 9 mosaic DNA constructs. Since the env have much more diversity than either gag or pol, mosaic env 1 favours CRF01_AE, mosaic env 2 favours both CRF01_AE+B and mosaic env 3 was more or less the same as mosaic 2 with some modification to fill in some of the gaps occurred in mosaic env 2. All constructs were proved to have good protein expressions.

3.2 Cell-mediated immune responses to env AE pooled peptides stimulation in DNA alone and in gag/pol/env combination groups

When stimulated with env AE pooled peptides, the mosaic env 1+2+3 DNA alone group could induce good cell-mediated immune response, 1088(938-1713) spot forming unites (SFU)/1x10^6 splenocytes. The response was much higher after boosting with 5-million pfu of vaccinia-AE, 2012(1836-2256) SFU/1x10^6 splenocytes (p = 0.0022). Vaccinia-B could also boost the

response to 1683 (997-2004) SFU/1x10^6 splenocytes but not significantly different from DNA priming only [1088 (938-1713) SFU/1X10^6] (**Figure 1**).

For the mosaic gag/pol/env combination group, it was surprising that the response was significantly lower, 81(8-751) SFU/1x10^6 splenocytes, than the mosaic env 1+2+3 DNA alone group (p = 0.0022). After boosting with 12-million pfu of vaccinia –AE gag/pol/env, the response was brought up to 1833(836-2026) SFU/1x10^6 splenocytes which was significantly difference (p = 0.0022) from the mosaic gag/pol/env alone group. This mosaic gag/pol/env/v_boosted response was not significantly different from the mosaic env 1+2+3/vEnv E boosted or from the mosaic env 1+2+3/vEnv B boosted (**Figure 1**).

The responses of mosaic env 1+2+3 were much higher than the positive control groups, recombinant vaccinia-AE (rVV_AE) or B (rVV_B), were much higher (p = 0.0080 and p = 0.0043, respectively) (**Figure 1**). For the mosaic gag/pol/env group, although the responses were almost the same as the positive control groups, boosting with 12-million pfu of vaccinia–AE gag/pol/env significantly enhanced the response ((p = 0.0080 as compared to positive control groups), (**Figure 1**).

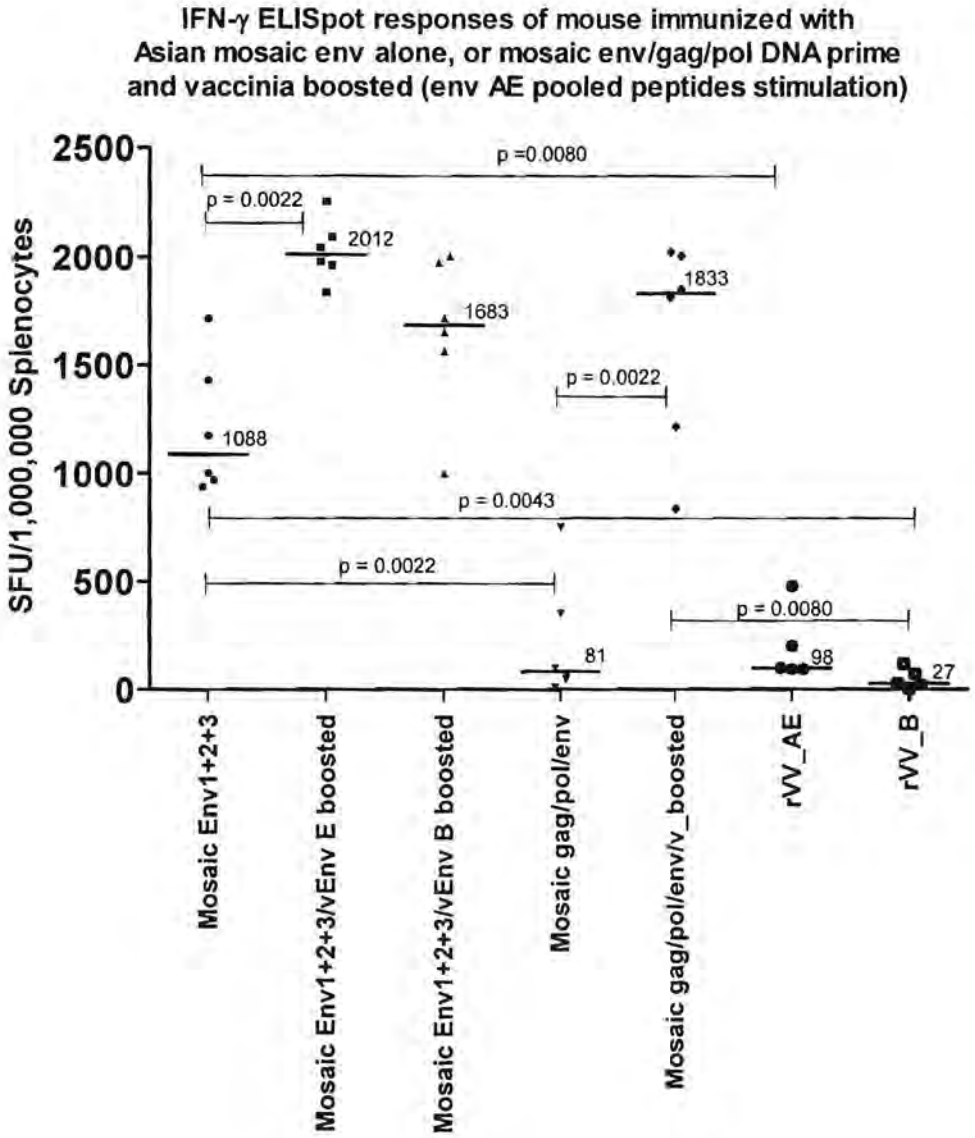

Figure 1 The median IFN-γ ELISpot responses to env AE pooled peptides stimulation of mouse immunized with Asian mosaic env alone, mosaic gag/pol/env, mosaic env DNA prime/recombinant vaccinia boost and mosaic gag/pol/env DNA prime/recombinant vaccinia boost.

3.3 Cell-mediated immune responses to env B pooled peptides stimulation in DNA alone and in gag/pol/env combination groups

When stimulated with env B pooled peptides, the mosaic env 1+2+3 DNA alone group could also induce good response, 680(472-1700) SFU/1x10^6 splenocytes. The response was higher after boosting with 5-million pfu of vaccinia-AE, 1550(1025-1694) SFU/1x10^6 splenocytes even was not statistically difference. However, the boosting with vaccinia-B could induce significant higher response 1654(1284-1950) SFU/1x10^6 splenocytes (p = 0.0152, **Figure 2**).

For the mosaic gag/pol/env combination group, it was again surprising that the response was significantly lower, 18(13-706) SFU/1x10^6 splenocytes, than the mosaic env 1+2+3 DNA alone group (p = 0.0304). After boosting with 12-million pfu of vaccinia -AE gag/pol/env, the response was brought up to 1285(387-1867) SFU/1x10^6 splenocytes which was significantly difference (p = 0.0129) from the mosaic gag/pol/env alone group. However, the responses had no statistical difference when compared the mosaic gag/pol/env/v_boosted to either the mosaic env 1+2+3/vEnv E boosted or mosaic env 1+2+3/vEnv B boosted (**Figure 2**). The responses of mosaic env 1+2+3 as compared to the positive control groups, rVV_AE or rVV_B were much higher (p = 0.0080 for both groups (**Figure 2**). For the mosaic gag/pol/env group, even the responses was almost the same as the positive control groups, the boosting with 12-million pfu of vaccinia –AE gag/pol/env could again significantly enhance the response ((p = 0.0080), **Figure 2**.

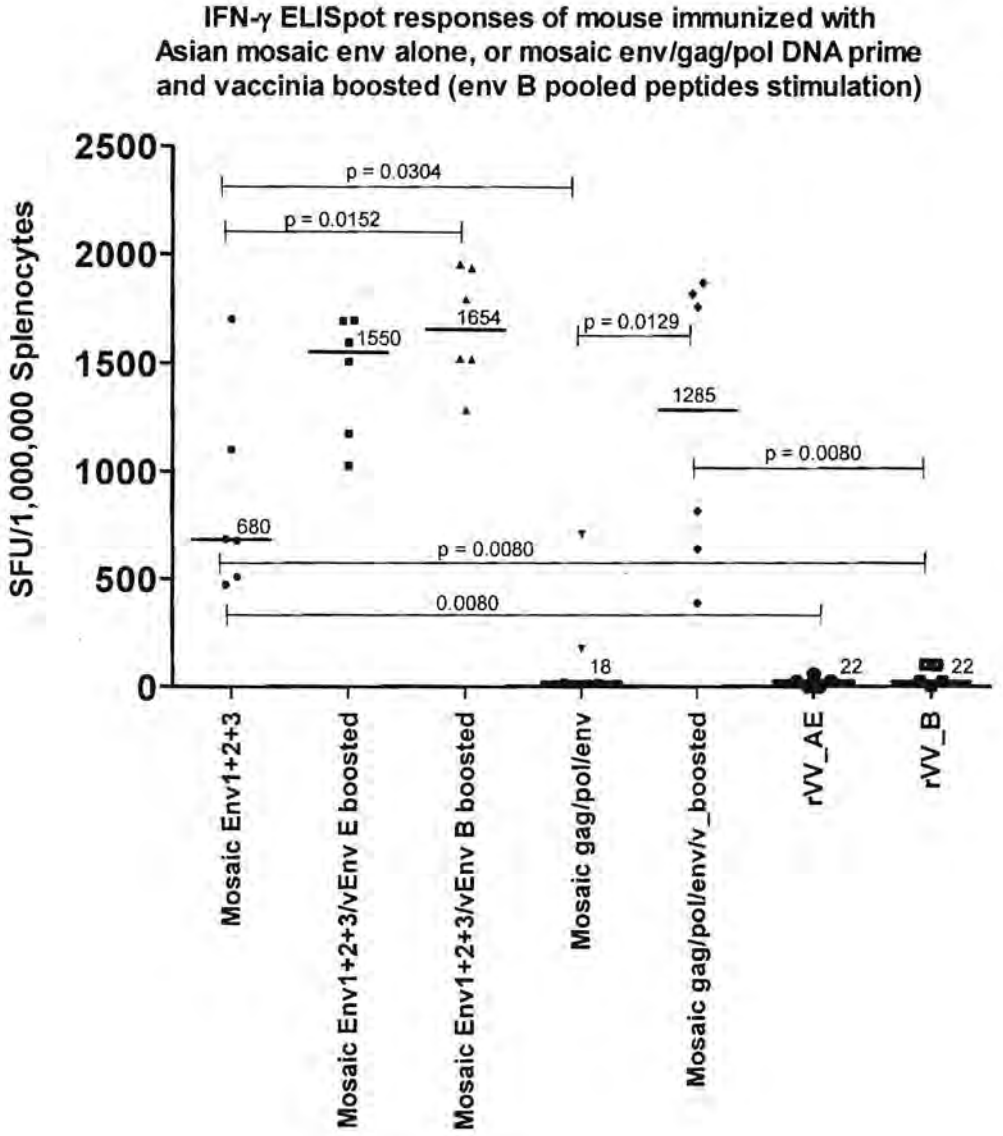

Figure 2 The median IFN- γ ELISpot responses to env B pooled peptides stimulation of mouse immunized with Asian mosaic env alone, mosaic gag/pol/env, mosaic env DNA prime/recombinant vaccinia boost and mosaic gag/pol/env DNA prime/recombinant vaccinia boost.

4. Discussion

The Asian mosaic env DNA, either being used alone or as combination of gag/pol/env, was proved immunogenic, especially with the DNA prime/vaccinia boost strategy. It is quite surprising but is explainable that the immunization with mosaic env 1+2+3 DNA alone (3 mosaic DNA constructs) was much more immunogenic than the mosaic gag/pol/env DNA combination (1088 vs 81 and 680 vs 18 SFU/1x10^6 splenocytes when stimulated with env-AE and env-B pooled peptides, respectively). This is because of the 3-fold less env DNA in the mosaic gag/pol/env combination (9 mosaic DNA constructs as compared to only 3 DNA constructs in the mosaic env 1+2+3 only group). For example, if a total of 100 μg DNA was used for immunization, the amount of env 1 or 2 or 3 constructs in the mosaic env 1+2+3 was 33 μg per construct but it was only 11 μg per construct in the mosaic gag/pol/env combination group.

In spite of the lower T-cell response with mosaic gag/pol/env DNA immunization, boosting with gag/pol/env recombinant vaccinia could heighten the env immune response to the same level as env only prime /env only boost. It indicates that less env DNA can be used for priming if strong boosting is given. This may lower the cost of DNA vaccination.

Our results clearly show that the mosaic env DNA constructs cover both the HIV-I AE and B subtypes since it could be boosted equally well by both env AE and env B recombinant vaccinia. In addition, both env AE and env B pooled peptides could stimulate the *in vitro* T-cell response equally well in the immunized mice, again showing the broad immunogenicity of the mosaic vaccine.

Our results are in accordance with many other reports of increasing breadth and depth of immune responses by mosaic immunogens [20, 22-24]. Santra et al reported the increased breadth of cellular and humoral immune responses elicited in rhesus monkeys by multi-valent

mosaic as compared to consensus immunogens [23]. Kong et al, reported the expanded breadth of the T-cell response to mosaic human immunodeficiency virus type 1 envelope DNA targeting HIV-1 envelope [24]. However, the DNA prime/vaccinia boost strategy could enhance comparable responses between the 2 groups (mosaic env 1+2+3 vs mosaic gag/pol/env), i.e., 2012 vs 1833 and 1683 vs 1833 SFU/1x10^6 splenocytes when stimulated with env-AE pooled peptides. This is also true when stimulated with env-B pooled peptides, 1550 vs 1285 and 1654 vs 1285 SFU/1x10^6 splenocytes.

To further advance the clinical development of our Asian mosaic HIV-1 vaccine, we are in the process of testing our DNA prime / recombinant vaccinia boost strategy in pigtailed macaque In addition to humoral and cell-mediated immunity evaluation, challenge with recombinant Simian/human HIV-1 (SHIV) with AE, B and AE/B subtypes is planned

References

[1] Fauci AS, Macher AM, Longo DL, Lane HC, Rook AH, Masur H, et al. NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. Ann Intern Med 1984;100(1):92-106.

[2] Centers for Disease Control. *Pneumocystis* pneumonia-Los Angeles. MMWR 1981;30:250-2.

[3] Centers for Disease Control. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among men-New York City and California. MMWR 1981;25:305-8.

[4] Excler JL, Tomaras GD, Russell ND. Novel directions in HIV-1 vaccines revealed from clinical trials. Current Opin 2013, June 5.

[5] O'Connell RJ, Kim JH, Corey L, Michael NL. Human immunodeficiency virus vaccine trials. In:Bushman FD, Nabel GJ, Swanstro R, editors. HIV: from biology to prevention and treatment. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012. Pp. 483-504.

[6] Koff WC. HIV vaccine development: challenges and opportunities towards solving the HIV vaccine-neutralizing antibody problem. Vaccine 2012;30(29):4310-5.

[7] Kublin JG, Morgan CA, Day TA, Gilbert PB, Self SG, McElrath MJ, et al. HIV Vaccine Trials Network: activities and achievements of the first decade and beyond. Clin Investing (Lond) 2012;2(3):245-54.

[8] Koff WC. Accelerating HIV vaccine development. Nature 2010;464(7286):161-62.

[9] Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, Michael NL. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. Curr Opin HIV AIDS 2010;5(5):428-34.

[10] Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. Nature 2008;455(7213):613-19.

[11] Johnston MI, Fauci AS. An HIV vaccine-challenges and prospects. N Engl J Med 2008;359(9):888-90.

[12] Fauci AS, Johnston MI, Dieffenbach CW, Burton DR, Hammer SM, Hoxie JA, et al. HIV vaccine research: the way forward. Science 2008;321(5888):530-32.

[13] Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. N Engl J Med 2009;361(23):2209-20.

[14] Taylor BS, Sobieszcyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. N Engl J Med 2008;358(15):1590-602.

[15] Ndung'u T, Weiss RA. On HIV diversity. AIDS 2012;26(10):1255-60.

[16] Picker LJ, Hansen SG, Lifson JD. New paradigms for HIV?AIDS vaccine development. Annu Rev Med 2012;63:95-111.

[17] Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, Funkhouser R, et al. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. Nat Med 2007;13(1):100-6.

[18] Thurmond J, et al. Web-based design and evaluation of T-cell vaccine candidates. Bioinformatics 2008;24(14):1639-40.

[19] Santra S, Liao HX, Zhang R, Muldoon M, Watson S, Fischer W, et al. Mosaic vaccines elicit CD8+ T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. Nat Med 2010;16(3):324-8.

[20] Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, King SL, Abbink P, Maxfield LF, et al. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. Nat Med 2010;16(3):319-23.

[21] Sirivichayakul S, Thantiworasit P, Chatkulkawin P, Buranapraditkun S, Munier ML, Kelleher AD, et al. Immunogenicity assay validation for an HIV vaccine trial: high IFNγ+/IL-2+ CD8+ T cells background in healthy Thais. Vaccine 2011;29(35):6002-7.

[22] Korber BT, Letvin NL, Haynes BF. T-cell vaccine strategies for human immunodeficiency virus, the virus with a thousand faces. J Virol 2009;83(17):8300-14.

[23] Santra S, Muldoon M, Watson S, Buzby A, Balachandran H, Carlson KR, et al. Breadth of cellular and humoral immune responses elicited in rhesus monkeys by multi-valent mosaic and consensus immunogens. Virology 2012;428(2):121-7.

[24] Kong WP, Wu L, Wallstrom TC, Fischer W, Yang ZY, Ko SY, et al. Expanded breadth of the T-cell response to mosaic human immunodeficiency virus type 1 envelope DNA vaccination. J Virol 2009;83(5):2201-15.

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานต้นสังกัด

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) ดร.สุณี ศิริวิชยกุล

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Sunee Sirivichayakul, Ph.D.

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1008-00838-59-2

ตำแหน่งปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ (เชี่ยวชาญ) ระดับ 9

หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร. 0-2256-4579

โทรสาร. 0-652-3100

E-mail: ssunee@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	2528
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2534
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ด.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2546

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: HIV Molecular and Immunology

PUBLICATIONS : นับจนถึงปัจจุบันมีทั้งหมด 33 เรื่อง

2. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) สุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Supranee Buranapraditkun

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-1009-01383-52-3

ตำแหน่งปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ (ชำนาญการ) ระดับ 7

นิสิตปริญญาเอก

หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร. 0-2256-4579

โทรสาร. 0-652-3100

E-mail: bsuprane2001@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	2538
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2545

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: AIDS, Cellular Immunology

1'2821/522

3. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวภัทราวดี พิทักษ์พลรัตน์

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Patrawadee Pitakpolrat

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-3099-00423-38-2

ตำแหน่งปัจจุบัน: นักวิจัย

หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร. 0-2256-4152 โทรสาร. 0-2254-2323

E-mail : pitakpolrat@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยบูรพา	วท.บ.	ชีววิทยา	2540
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วท.ม.	พันธุวิศวกรรม	2544

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: Molecular Biology

4. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายภัทรวัจน์ ตันติวรสิทธิ์

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Pattarawat Thantiworasit

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-7208-00028-89-7

ตำแหน่งปัจจุบัน: นักวิจัย

หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร. 0-2256-4579 โทรสาร. 0-2652-3100

E-mail : pattarawat1@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์ (เกียรตินิยมอันดับ 2)	2547

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: HIV Immunology

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Kiat Ruxrungtham, M.D.

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3-5099-01159-31-8

ตำแหน่งปัจจุบัน: ศาสตราจารย์

หน่วยงานและสถานที่ที่ติดต่อได้: สาขาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่ 1873 ถ.พระราม 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทร. 0-2256-4152 โทรสาร. 0-2254-2323

E-mail : rkiat@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	พ.บ.	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1)	2522
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม	อายุรศาสตร์	2526
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ม.	สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์	2531-2532
Laboratory of Immunoregulation (LIR) National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) National Institutes of Health (NIH)	Visiting Researcher	HIV Immunology	2534-2536

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ: HIV Molecular and Immunology, Allergy

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

โครงการวิจัยอื่นๆที่กำลังดำเนินการ 4 โครงการ

ลำดับที่	ผู้วิจัยหลัก	หัวข้อเรื่อง	แหล่งทุน	ปีที่ได้
1	ศ.นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม	ทุนวิจัยและพัฒนา Dengue DNA tetravalent vaccine	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	2551
2	ศ.นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม	โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนและอิมมูนบำบัดต้านโรคเอดส์และโรคภูมิแพ้	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ	2548-2552
3	ศ.นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม	การตอบสนองของ dengue specific T cells ในอาสาสมัครที่เคยติดเชื้อไวรัสเด็งกี่	ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553	2553
4	ศ.นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม	ความสำคัญและความชุกของเชื้อเอชไอวีที่เป็นประชากรส่วนน้อยที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสเอชไอวี	สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา	2553

CLINICAL RESEARCH EXPERIENCES

1. Co-investigator in more than 10 phase I or II or III clinical trials both in both in HIV-related studies and allergy/asthma-related studies such as the Gaining Optimal Asthma Control **(GOAL)** study, **SAS 30023** and SAS 30024 studies
2. Principal investigator in more than 20 phase I or II or III clinical trials both in HIV-related studies and allergy/asthma-related studies

MEMBER OF PROFESSIONAL ORGANIZATION

1. Research forum co-ordinator, and the member of The Allergy and Immunology Society, Thailand (AIST)
2. The member of The Royal College of Physician, Thailand (RCPT)
   The member of the Thai AIDS Society (TAS)

Scientific committee of the Thai Asthma Council (TAC)ADVISORY AND COMMITTEE MEMBER

1. Local organizing committee member of the World Allergy Congress Thailand 2007
2. Vaccine Research and Development Sub-Committee, National Vaccine Committee, Ministry of Public Health
3. Scientific Review Sub-committee on AIDS Research Fund (Biomedical research), Bureau of University Affairs, Ministry of Education, Thailand
4. Member of National Sub-committee on HIV/AIDS treatment and care, Bureau of AIDS, TB, and STDs, CDC, Ministry of Public Health, Thailand
5. The chair of the scientific subcommittee of the National Health Social Security Office (NHSO) on AIDS treatment and care from 2550-present

PUBLICATIONS: more than 140 publications in international peer reviewed journals in immunology, allergy and HIV. Five book chapters in international textbooks

MAJOR RESEARCH GRANTS AWARDED:

1. Thai BIOTEC 5 years grant award for DNA vaccine development 2005-2009
2. CIPRA, NIAID, the U.S. NIH 5 years grant award 2004-2009 with 2 yrs extension to address "When to start HAART in pediatric HIV patients" the project named "PREDICT"