

Anrs
research
on HIV
vaccine

La recherche
vaccinale
contre le VIH
à l'Anrs

anRS Recherches sur/Research on

English version, p. 1

Version Française, p. 33

References, p. 65

***This brochure selectively addresses
the current R&D effort of ANRS
on a lipopeptide-based
strategy for HIV vaccines***

**Seule la stratégie « lipopeptides »
est détaillée dans ce fascicule.**



La recherche
vaccinale
contre le VIH
à l'Anrs

anRS) Recherches sur/Research on

COMITÉ ÉDITORIAL

Elisabeth Fischer, *ANRS*

Jean-Gérard Guillet, *INSERM Unité 445*

Michel Kazatchkine, *ANRS*

Marie-Christine Simon, *ANRS*

SECRETARIAT DE RÉDACTION

Jennifer Daubanes

Morgane Nicolas

RÉDACTION

RCP Communication

TRADUCTION

David Marsh

Document réalisé par le service Information scientifique et communication

Conception graphique : Epilobe

■ Sommaire

- 1. Introduction** p.37
- 2. Une recherche transversale** p.39
 - La recherche d'un vaccin préventif
- 3. Une stratégie originale :
les lipopeptides** p.43
 - La mise en application du concept des lipopeptides
 - Les essais chez l'animal
 - Les essais chez l'homme
 - Les perspectives
- 4. Le vaccin thérapeutique** p.57
- 5. Le réseau de recherches
vaccinales** p.59
 - Le réseau vaccinal préventif
 - Les partenaires industriels
 - Les collaborations internationales
- Références** p.65



■ Introduction



L''épidémie de VIH/sida est d'une gravité sans précédent et continue de s'étendre rapidement, notamment dans les régions du monde les plus défavorisées. Pour espérer enrayer sa progression, la recherche d'un vaccin préventif est une priorité absolue.

L'ampleur prise par l'épidémie de VIH/sida a dépassé les prévisions les plus pessimistes. Le nombre de personnes infectées par le VIH dans le monde est actuellement estimé à 42 millions. Depuis le début de l'épidémie, le sida a fait plus de 25 millions de morts. L'Onusida prédit que, dans les vingt prochaines années, 70 millions de personnes pourraient mourir du sida dans les 45 pays les plus touchés.

L'épidémie ne cesse de se développer en Afrique sub-saharienne, continent le plus touché au monde, où elle menace à court terme les acquis de dizaines d'années de développement. En l'absence d'une meilleure prévention et d'un meilleur accès aux traitements d'ici 2010, le sida y augmentera le taux de décès de 40 %. L'épidémie progresse également rapidement en Chine et en Inde, sans épargner l'Europe de l'Est et la Russie, ainsi que l'Amérique Latine et les Caraïbes.

L'épidémie n'épargne pas non plus les pays riches. On compte ainsi 1,5 million de personnes infectées par le VIH aux Etats-Unis et en Europe. L'arrivée des multithérapies antirétrovirales au milieu des années 90 s'est traduite par une diminution des deux tiers de la mortalité et de la morbidité associées à l'infection par le VIH. Toutefois, ces traitements présentent des limites : ils ne permettent pas l'éradication du virus, ils se heurtent à des résistances virales, et ils s'accompagnent d'effets indésirables invalidants et/ou sérieux. De plus, leur coût limite leur accès au plus grand nombre dans les pays défavorisés.

La situation de l'épidémie et ses conséquences sur le plan humain, économique et social, conjuguées aux limites des traitements actuels et à leur indisponibilité pour la majorité des malades rendent prioritaire la recherche d'un vaccin préventif contre l'infection par le VIH. Seul un vaccin efficace, sûr, de large spectre et accessible permettra d'obtenir une prévention primaire, individuelle, se prêtant à une stratégie de masse et d'enrayer ainsi la progression de l'épidémie.

L'ANRS s'est engagée depuis plus de 10 ans dans un programme original alliant recherche fondamentale et recherche clinique. Un cinquième de son budget, soit environ 10 millions de dollars, est consacré au vaccin préventif. Ce fascicule résume la stratégie de recherche et développement de l'ANRS utilisant des lipopeptides.

Michel Kazatchkine
Directeur de l'ANRS



Une
recherche transversale

Le programme de recherches de l'Agence en matière de vaccin préventif couvre l'ensemble des champs expérimentaux : recherche d'amont pour la définition d'immunogènes, recherche animale et recherche clinique pour l'évaluation de candidats vaccins. Parallèlement, l'ANRS développe une stratégie vaccinale basée sur l'utilisation de lipopeptides.

La recherche d'un vaccin préventif

■ LA SITUATION DE LA RECHERCHE SUR LE VACCIN PRÉVENTIF ANTI-VIH

Au milieu des années 80, les scientifiques s'orientent d'emblée sur l'induction d'une réponse immunitaire à médiation humorale en utilisant les protéines du VIH-1 les plus exposées au système immunitaire. Les premiers immunogènes qui visent la production d'anticorps capables de neutraliser l'infection sont constitués de protéines d'enveloppe recombinantes obtenues par génie génétique afin d'éviter toute contamination par le VIH lors des vaccinations. Malgré des résultats encourageants chez le chimpanzé, les scientifiques se sont vite aperçus que ce type de vaccin induisait des anticorps inefficaces vis-à-vis des souches « sauvages » responsables des infections chez l'homme.

Les chercheurs s'engagent alors vers l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire. Ce type d'immunité fait intervenir les lymphocytes T auxiliaires (T CD4) et les lymphocytes T cytotoxiques CTL (T CD8). L'intérêt des réponses à médiation cellulaire a été largement documenté dans les modèles expérimentaux de l'infection chez le singe et l'étude de la primo-infection par le VIH chez l'homme. La réponse CTL est dirigée contre les protéines de structure (Env, Gag et Pol) et de régulation (Tat, Rev et Nef) du VIH.

En 2003, la plupart des chercheurs pensent qu'il sera possible d'obtenir une protection vaccinale partielle, par l'induction d'une réponse cellulaire, forte et multiépitopique. Quant à la réponse humorale, si elle bénéficie des progrès (notamment structuraux) réalisés dans la compréhension des mécanismes d'entrée du VIH dans la cellule, elle demeure encore une perspective lointaine. C'est pourquoi, la stratégie développée par l'ANRS dans ses essais vaccinaux, comme les autres

stratégies en essais cliniques dans le monde, s'oriente vers l'induction d'une réponse cellulaire.

Un vaccin de ce type serait un vaccin de première génération, d'efficacité partielle. Il n'empêcherait pas l'infection mais diminuerait la charge virale au décours de la primo-infection et assurerait un bénéfice individuel important en permettant une longue période d'évolution asymptomatique de la maladie. À l'échelle individuelle et des populations, il pourrait permettre l'épargne du recours aux antirétroviraux pendant plusieurs années pour de nombreuses personnes atteintes. De plus, en diminuant la charge virale moyenne dans la population, la vaccination aurait un effet sur la transmissibilité du VIH et donc un impact en santé publique.

Depuis sa création, l'ANRS a fait de la recherche d'un vaccin contre l'infection par le VIH une de ses priorités. L'Agence est ainsi devenue l'un des principaux acteurs internationaux dans ce domaine.

■ La recherche d'amont

Les travaux soutenus par l'ANRS portent notamment sur :

- La mise au point et la comparaison de nouveaux vecteurs de vaccination.
- Le développement de nouveaux immunogènes.
- L'étude des cellules dendritiques et de la présentation antigénique.
- La conception et l'évaluation de formulations vaccinales permettant d'induire une immunité mucoale.
- Le développement de tests d'exploration de la réponse immunitaire à médiation humorale et cellulaire.

■ La recherche animale

Des modèles simiens sont utilisés pour évaluer les nouvelles stratégies vaccinales. Les essais réalisés sont destinés à évaluer l'efficacité des nouveaux candidats vaccins, notamment l'induction d'une réponse immune persistante et d'une protection vis-à-vis de la transmission du virus par voie muqueuse ou systémique.

D'autres essais visent à améliorer l'efficacité des vecteurs, à évaluer de nouveaux types d'adjuvants et de protéines recombinantes, ou à tester l'efficacité d'une vaccination thérapeutique chez des animaux infectés et traités par une polychimiothérapie antivirale.

Enfin, la standardisation, au sein de l'Agence, des protocoles expérimentaux et des méthodes nécessaires au suivi des animaux après vaccination et épreuve per-

met de comparer l'efficacité des approches vaccinales développées par les différentes équipes.

■ La recherche clinique

L'ANRS met en œuvre des essais cliniques de phase I et II pour évaluer la tolérance et la capacité des candidats vaccins à induire une réponse immunitaire. Depuis 1992, une quinzaine d'essais ont été réalisés sous l'égide de l'ANRS. Les candidats vaccins testés ont été des virus canarypox recombinants (Alvac) de plus en plus complexes contenant des séquences codant pour certaines protéines virales, utilisés seuls ou associés à d'autres immunogènes (protéines de l'enveloppe entières ou tronquées). L'ANRS développe également une stratégie originale basée sur l'utilisation de lipopeptides. Ceux-ci sont constitués de fragments synthétiques de protéines du virus associés à des lipides facilitant l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire. Ces approches (Alvac et lipopeptides) ont permis très tôt d'évaluer la stratégie « prime-boost ». Cette stratégie de vaccination qui permet d'amplifier la réponse immunitaire s'effectue en deux temps : une primo-immunisation avec un vaccin recombinant suivie d'un rappel (boost) avec des fractions protéiques du virus VIH.



3

■ Une stratégie originale : les lipopeptides

Depuis 1994, l'ANRS développe une stratégie vaccinale originale basée sur l'utilisation de lipopeptides et visant à obtenir une réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Depuis 1994, l'ANRS développe une stratégie vaccinale visant à induire une réponse cellulaire multiépitopique par l'administration de lipopeptides. Les lipopeptides sont des molécules hybrides constituées de larges fragments synthétiques de protéines virales associés à une chaîne lipidique monopalmitoylée, les deux entités étant liées de façon covalente. Ces constructions synthétiques permettent d'accroître l'immunogénicité sans recours à un adjuvant. La partie lipidique assure une meilleure pénétration intracellulaire du peptide dans les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques), favorisant ainsi la réponse immunitaire cellulaire.

La stratégie vaccinale de l'ANRS s'est construite au cours des années en s'appuyant sur les résultats de recherches pluridisciplinaires impliquant en particulier, biologistes et chimistes.

■ Les pré-requis

L'idée d'utiliser des séquences peptidiques courtes immunogènes provenant de plusieurs protéines du VIH pour induire des réponses cellulaires spécifiques trouve son origine dans des travaux qui remontent à la fin des années 80.

À cette époque, les immunologistes avaient élucidé les bases moléculaires du phénomène de restriction par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les lymphocytes T reconnaissent un antigène étranger lorsqu'il est présenté sous forme de peptides à la surface d'une cellule en association avec un antigène de restriction du soi. La question qui se pose alors est de savoir comment un nombre incalculable de protéines étrangères peut former des complexes uniques avec un nombre très limité de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

Entre 1986 et 1987, des chercheurs au département de biologie du MIT (Jean-Gérard Guillet), étudient les propriétés de reconnaissance de différents peptides par des cellules T classe II-restreintes. Leurs travaux montrent que plusieurs peptides analogues au peptide initial, mais aussi des peptides dérivés d'autres antigènes peuvent inhiber de manière compétitive l'activation de ces cellules T par le peptide initial (Guillet J.G., Lai M.Z. et al. *Nature*, 1986). À partir de ces résultats, ils suggèrent un modèle dans lequel tous les antigènes génèrent des peptides qui peuvent se fixer au même site sur une molécule du CMH. La reconnaissance par les

cellules T de ce site supposé polymorphique, complexé avec l'antigène, explique la sélection du soi dans le thymus et la restriction par le complexe majeur d'histocompatibilité.

Parallèlement, au sein de l'Institut Cochin, dans l'unité INSERM U152 (dirigée par Jean-Paul Lévy), est démontrée pour la première fois l'association physique entre des molécules de classe I et différents peptides immunogènes (Bouillot M., Choppin J. et al. *Nature*, 1989). Par la suite, ces travaux seront poursuivis dans le même institut à l'INSERM U445 (dirigée par Jean-Gérard Guillet). À l'aide d'un test qui mesure l'attachement de molécules du CMH de classe I à des peptides antigéniques, les chercheurs observent que les peptides antigéniques peuvent se fixer spécifiquement sur différentes molécules de classe I avec des affinités différentes. Ces travaux indiquent que des différences quantitatives dans les interactions peptides/molécules du CMH de classe I ou de classe II influencent le profil de restriction observé *in vivo*. Après avoir confirmé l'interaction d'un grand nombre de peptides antigéniques avec des molécules HLA purifiées de classe I (Choppin J., Martinon F. et al. *J Exp Med*, 1990), il est montré que la fixation aux molécules du CMH dépend de la longueur du peptide, mais aussi de sa charge et de la présence de résidus hydrophobes. Enfin, les chercheurs observent que la distribution des épitopes reconnus par les cellules T ne se fait pas d'une manière aléatoire au sein des protéines du VIH mais que des regroupements (« clusters »), dans certaines régions, peuvent être observés ; ces observations et résultats seront à la base de la stratégie vaccinale que l'ANRS développera.

À partir de ce moment, des études systématiques de peptides issus des séquences complètes de toutes les protéines du VIH seront réalisées afin de cartographier des domaines polyépitopiques pouvant constituer les meilleurs immunogènes.

■ La sélection d'épitopes

Dans une série d'articles originaux, des équipes de recherche constituées en réseau grâce au soutien de l'ANRS (voir chapitre 5), identifient, par un test de fixation/compétition de peptides sur les molécules HLA, une série de régions polyépitopiques appartenant à de nombreuses protéines du VIH (Choppin J., Martinon F. et al. *J Immunol*, 1991 a et b). Le caractère immunogène de ces fragments peptidiques est vérifié par l'induction d'une réponse immunitaire médiée par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Plusieurs domaines identifiés dans la région centrale de la protéine Nef contiennent de nombreux épitopes CD8 multi-restreints contre lesquels des réponses sont retrouvées

chez 97 % des donneurs séropositifs ayant une réponse contre la protéine Nef (Culmann-Penciolelli B., Lamhamedi-Cherradi S. et al. *J Virol*, 1994). Une analyse de la variabilité de ces épitopes Nef chez les patients révèle que certaines mutations entraînent une forte réduction de l'activité CTL et sont responsables de l'échappement à la réponse (Couillin I., Culmann-Penciolelli B. et al. *J Exp Med*, 1994).

Dans le contexte d'une stratégie vaccinale basée sur des peptides immunogènes induisant une réponse CTL polyclonale, ces travaux pionniers indiquent qu'il est nécessaire de concevoir de grands fragments peptidiques contenant des « clusters » d'épitopes qui correspondent à plusieurs haplotypes. Pour éviter le risque d'échappement, il faut sélectionner les épitopes immunogènes dans des régions les plus conservées du VIH. Les critères de sélection des peptides sont : une forte affinité pour les molécules de classe I, la capacité à former un complexe stable avec ces molécules, la capacité à induire une activité cytotytique CTL.

Le même type de travail a été ensuite réalisé au sein du département d'ingénierie et d'étude des protéines du CEA par le groupe dirigé par Bernard Maillère, pour cartographier également les épitopes CD4 contenus dans les protéines du VIH et se fixant aux molécules du CMH de classe II. Enfin, des régions contenant des « clusters » d'épitopes CD8 et CD4 pour différents haplotypes ont été identifiées et sélectionnées. Ces constructions ont été synthétisées ou insérées dans différents vecteurs pour tester leurs capacités immunogènes *in vivo*.

La mise en application du concept des lipopeptides

L'utilisation de peptides dans les préparations vaccinales est une approche alternative à l'utilisation de vecteurs recombinants. Les atouts majeurs d'un vaccin peptidique sont la spécificité de la réponse induite et le faible niveau de risque comparés aux vaccins composés de virus inactivés ou atténués. Un autre avantage de cette approche est qu'elle permet de diriger la réponse immune contre des épitopes T sous-dominants. Cependant, pour être suffisamment immunogènes, les peptides doivent être injectés avec des adjuvants, comme l'adjuvant incomplet de Freund. Pour éviter l'utilisation d'adjuvants, les chimistes André Tartar et Hélène Gras-Masse (CNRS et Institut Pasteur de Lille) en collaboration avec les

immunologistes de l'unité INSERM U445 ont proposé de coupler directement les peptides à une molécule lipidique simple, origine du concept de lipopeptide. Ces derniers sont donc des peptides reliés par leur extrémité carboxy-terminale à une partie lipidique comprenant un groupe palmitoyl.

Une première étude *in vivo* réalisée chez la souris a permis de démontrer le potentiel immunogène des lipopeptides (Martinon F., Gras-Masse H. et al. *J Immunol*, 1992). Les auteurs de ce travail ont comparé la capacité à induire des réponses cytolytiques CTL entre des peptides synthétiques et des lipopeptides simples contenant le même épitope T immunodominant de la protéine gp160 du VIH. Alors que les peptides libres étaient peu immunogènes, les lipopeptides ont induit de fortes réponses CTL primaires fonctionnelles. Des lipopeptides de 16 ou 34 acides aminés étaient aussi efficaces, indiquant que plusieurs épitopes pouvaient être inclus dans une seule construction. Des réponses « T helper » (activation des lymphocytes CD4) ainsi que des réponses B (production d'anticorps) ont également été obtenues. Ainsi, une construction lipopeptidique simple peut-elle induire une réponse immune totale.

Un mécanisme de l'induction d'une réponse cellulaire T par les lipopeptides a été récemment suggéré (Andrieu M., Desoutter J.F. et al. *J Virol*, 2003). Pour induire une réponse cellulaire, un antigène doit être dégradé et présenté à la surface d'une cellule dendritique, responsable de la stimulation primaire des lymphocytes T. La partie lipidique du lipopeptide permet à la molécule d'entrer efficacement dans les cellules dendritiques. Cette entrée étant non-spécifique, toutes les cellules dendritiques peuvent être sensibilisées sans restriction. Après endocytose, les différents épitopes contenus dans le lipopeptide sont présentés en association avec les molécules du CMH de classe I par les cellules dendritiques aux lymphocytes T CD8 spécifiques. En suivant le devenir de lipopeptides marqués dans les cellules dendritiques par microscopie confocale, il a pu être observé que les voies cytoplasmiques et endosomiales étaient utilisées pour conduire à la présentation par les molécules du CMH.

Ces recherches ont fait l'objet de brevets. Parmi ceux-ci :

- Concept de base portant sur l'utilisation des lipopeptides pour l'obtention d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Brevet accepté aux Etats-Unis et en Europe.
- Obtention d'une réponse cellulaire par les lipopeptides obtenus par synthèse colinéaire.
- Formulation des lipopeptides sous forme de micelle.
- Identification des épitopes CD8 contenus dans les lipopeptides.

- Identification des épitopes CD4 contenus dans les lipopeptides.
- Nouveau processus de fabrication des lipopeptides.

Ce portefeuille de brevets appartient aux établissements de recherche français - CNRS, Inserm, CEA et Institut Pasteur de Lille - qui les ont licenciés à des entreprises.

Les essais chez l'animal

Après l'identification préliminaire de régions riches en épitopes HLA I/II dans les protéines du VIH, plusieurs compositions lipopeptidiques contenant chacune une trentaine d'acides aminés correspondant à des « agrégotopes » immunogènes provenant des protéines du VIH ont été synthétisées. En mélange, les lipopeptides forment des micelles, ce qui augmente leur solubilité. Ces mélanges sont évalués pour leur capacité à induire chez la souris, dans des conditions expérimentales précises, une réponse cellulaire T CD8 correspondant à un phénotype cytotoxique. D'une façon similaire, des constructions sélectionnées sont ensuite évaluées dans le modèle SIV/macaque pour vérifier leur immunogénicité chez le primate. L'efficacité des réponses induites à contrôler la maladie peut être testée après une infection d'épreuve par un virus pathogène.

Un mélange de 7 lipopeptides synthétisés à partir des séquences de régions immunogènes connues des protéines Nef et Gag du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) a été injecté à des macaques rhésus. Les animaux ont présenté des réponses CTL spécifiques et fonctionnelles, détectables jusqu'à au moins 10 mois après l'injection (Bourgault I., Chirat F. et al. *J Immunol*, 1994). Des anticorps ont également été observés chez tous les animaux. Une autre expérience dans laquelle les lipopeptides ont été optimisés par l'ajout d'un peptide « T-helper » du toxoïde tétanique (TT), a montré qu'une forte réponse CD4 est corrélée à l'induction d'une réponse multiépitopique CD8 (Mortara L., Gras-Masse H. et al. *J Virol*, 1999). Après une épreuve infectieuse, les macaques répondeurs contrôlent mieux la virémie d'épreuve que les autres. Les lipopeptides sont ainsi capables d'induire des réponses B et T chez le primate.

Les essais chez l'homme

La stratégie vaccinale basée sur les lipopeptides a été évaluée dans le cadre de plusieurs essais mis en œuvre par l'ANRS. La plupart de ces essais associent les lipo-

peptides à un vecteur viral dans lequel sont insérés des gènes qui codent pour les mêmes séquences que celles que l'on retrouve dans les lipopeptides. Jusqu'à présent, les essais de l'ANRS ont fait appel au vecteur Canarypox (Alvac) qui a été développé par Aventis-Pasteur avec le soutien de l'ANRS. Dans les prochains essais, l'ANRS utilisera d'autres vecteurs viraux, tels que le MVA (virus Ankara) ou des adénovirus dans le même type de stratégie d'association d'un vecteur viral et d'un lipopeptide.

Les essais vaccinaux de l'ANRS terminés

Essais	Immunogènes	Objectif
ANRS VAC01 ¹	ALVAC (vCP125 ³) + rgp160	« prime-boost », immunisation limitée à l'enveloppe
ANRS VAC02 ¹	rgp 160 + peptide V3	« prime-boost », immunisation limitée à l'enveloppe analogue à celle protectrice chez le chimpanzé
ANRS VAC03 ¹	ALVAC (vCP205 ⁴) + peptide CTLB-36 ⁵	« prime-boost », 1 ^e tentative de multi-immunisation
ANRS VAC04 ²	6 lipopeptides (Env, Gag, Nef)	1 ^e tentative de multi-immunisation par un mélange de lipopeptides
ANRS VAC05 ¹	ALVAC (vCP125) ou témoin ALVAC (vCP rage)	Etude mémoire sur les sujets vaccinés de l'essai VAC01
ANRS VAC06 ¹	ALVAC (vCP125) ou témoin ALVAC (vCP rage)	Etude mémoire sur les sujets vaccinés de l'essai VAC02
ANRS VAC07 ¹	ALVAC (vCP300 ⁶)	1 ^e tentative de multi-immunisation contenant des domaines CTL
ANRS VAC08 ¹	ALVAC (vCP205) ou peptide CTLB-36	Etude mémoire sur les sujets vaccinés de l'essai VAC03
ANRS VAC09 ²	6 lipopeptides (Env, Gag, Nef)	Etude mémoire sur les sujets vaccinés des essais VAC03 et VAC07

¹: promoteur Aventis-Pasteur; ²: promoteur ANRS; ³: exprimant la protéine Env (gp160); ⁴: exprimant les protéines Env (gp120), Gag et Pro; ⁵: peptide synthétique constitué d'un épitope T helper (p24) et d'un épitope B (V3); ⁶: exprimant les protéines Env (gp120), Gag, Pro et des domaines CTL des protéines Pol et Nef.

■ **ANRS VAC 04** est un essai de phase I ayant concerné 28 volontaires sains qui ont reçu 3 injections de 6 lipopeptides. Les résultats obtenus sur les paramètres de la réponse immune sont encourageants (Gahery-Segard H., Pialoux G. et al. *J Virol*, 2000; Pialoux G., Gahery-Segard H. et al. *Aids*, 2001).

Il a en effet été observé que :

- Les réponses anticorps sont présentes chez 90 % des sujets.
- Les réponses CD4 anti-VIH sont présentes chez 80 % des sujets ; elles sont multispécifiques.
- Les réponses CD8 cytotoxiques anti-VIH testées par ELISPOT et dans des tests de cytotoxicité conventionnels sont claires, reproductibles et multispécifiques dans plus de la moitié des cas.
- Des réponses cytotoxiques contre des protéines Nef issues d'autres virus que l'isolat vaccinant ont été enregistrées chez 3 des 4 sujets testés indiquant une immunisation contre des épitopes conservés et suggérant une possible protection des populations exposées à différents variants du VIH.

Les lipopeptides induisent donc des réponses cellulaires T fortes, multiépitopiques, de longue durée (plus de 2 ans) et reproductibles chez un nombre significatif de sujets vaccinés. Les lipopeptides sont bien tolérés : les réactions locales et systémiques, faibles et de courte durée dans ces essais, sont semblables à celles induites par d'autres candidats vaccins étudiés dans le monde.

■ **L'essai ANRS VAC09** est un essai mémoire dans lequel des lipopeptides ont été utilisés en doses de rappel chez les volontaires des essais VAC03 et VAC07 qui ont répondu à une première vaccination composée de 3 à 5 injections d'Alvac-VIH (vCP205 ou vCP300). Les résultats de cet essai ont montré que des lipopeptides pouvaient induire un effet rappel. Ceci constitue un avantage par rapport aux vaccins recombinants, Alvac ou adénovirus, qui nécessitent des doses vaccinales de plus en plus importantes pour surmonter l'obstacle de l'immunisation contre le vecteur.

Au vu de ces résultats prometteurs, l'ANRS s'est fixé l'objectif de poursuivre des essais vaccinaux de phase I et II chez les volontaires sains utilisant les lipopeptides. La décision d'effectuer un essai de phase III, qui permettra d'étudier l'efficacité de ce type de candidat-vaccin dans la population, sera prise à la lumière des résultats obtenus.

Une série d'au moins 8 essais de phase I ou II est en cours ou devrait débiter dans les deux prochaines années.

Les essais vaccinaux de l'ANRS en cours

ANRS VAC10

(phase I, promoteur Aventis-Pasteur, essai terminé en janvier 2003)

But	Tester de nouveaux mélanges de lipopeptides auxquels peut être ajouté un lipopeptide portant un épitope T helper
Nombre de volontaires	60 volontaires (répartis en 4 groupes)
Méthodologie	Essai monocentrique, comparatif, randomisé, ouvert
Candidat vaccin :	Canarypox recombinant ALVAC (vCP1452) exprimant la protéine d'enveloppe gp120 associée à la partie transmembranaire de la gp41, la protéine Gag, des domaines CTL de Nef et Pol. LIPO-5 : mélange de 5 lipopeptides synthétiques dont les séquences peptidiques représentent des épitopes CTL contenus dans les protéines Gag (aa 17-35 + aa 253-284), Pol (aa 325-355) et Nef (aa 66-97 + 116-145) du VIH-1. Chaque peptide est associé côté C-terminal à un acide monopalmitique via une lysine. LIPO-6T : LIPO-5 complété par un lipopeptide correspondant à un épitope CD4 de la toxine tétanique (aa 830-846).
Schéma de l'essai	5 injections à M0, M1, M3, M6 et M12 avec vCP1452 ou LIPO-5 ou LIPO-6T ou LIPO-6T + vCP1452 et suivi jusqu'à M24

ANRS VAC12

(phase I, promoteur Biovector Therapeutics SA, essai terminé en août 2002)

But	Tester un nouveau mélange où chaque lipopeptide est associé à un épitope T helper
Nombre de volontaires	15
Méthodologie	Essai monocentrique, ouvert
Candidat vaccin	LP HIV1 : mélange de 4 lipopeptides synthétiques dont les séquences peptidiques contenues dans les protéines Gag (aa 77-85), Pol-RT (aa 342-354), Pol (aa 476-484) et Nef (aa 62-82) du VIH-1. Chaque peptide est associé de façon colinéaire à un épitope T helper de la toxine tétanique (aa 830-843) qui est branché en N-terminal à un acide monopalmitique.
Schéma de l'essai	3 injections à M0, M1 M3 et suivi jusqu'à M12

(Les essais vaccinaux de l'ANRS en cours)

ANRS VAC17

(phase I, promoteur ANRS, essai terminé en octobre 2002)

But	Tester la réponse mémoire des lipopeptides sur des sujets vaccinés provenant de l'essai VAC10
Nombre de volontaires	35 : 25 issus des 4 groupes de VAC10 et 10 naïfs pour les antigènes de LIPO-6T (groupe témoin).
Méthodologie	Essai monocentrique, comparatif, ouvert
Candidat vaccin	LIPO-6T : voir VAC10
Schéma de l'essai	1 injection de rappel 16 à 18 mois après M12 de VAC 10 et suivi jusqu'à M6

Les essais vaccinaux de l'ANRS programmés

ANRS VAC16

(phase I, promoteur ANRS, début de l'essai prévu : septembre 2003)

But	Comparer les voies d'injection intradermique et intramusculaire dans le but de déterminer la voie d'immunisation la plus efficace et/ou la moins consommatrice de vaccin
Nombre de volontaires	45 (répartis en 2 groupes)
Méthodologie	Essai multicentrique, randomisé, stratifié, ouvert
Candidat vaccin	LPVIH1 : voir VAC12
Schéma de l'essai	3 injections à S0, S4 et S12 par voie IM ou ID et suivi jusqu'à S24.

ANRS VAC18

(phase II, promoteur ANRS, début de l'essai prévu : 2^e semestre 2003)

But	Déterminer la dose minimale optimale (essai « dose-ranging »)
Nombre de volontaires	132 (répartis en 4 groupes)
Méthodologie	Essai multicentrique, comparatif, randomisé, en double aveugle versus placebo
Candidat vaccin	LIPO-5 : voir VAC10 Placebo : diluant de LIPO-5 soit solution glucosée à 5 % tamponnée en Tris/HCl 20 mM.
Schéma de l'essai	4 injections à S0, S4, S12 et S24 avec 500 ou 150 ou 50 ou 0 µg de LIPO-5 et suivi jusqu'à S48.

*(Les essais vaccinaux de l'ANRS programmés)***ANRS VAC19 / HVTN042**

(phase II, promoteur NIAID (USA), début de l'essai prévu : fin 2003)

But	Confirmer à plus large échelle, sur des volontaires sains américains, les résultats précédemment obtenus avec LIPO-5 dans une stratégie vaccinale de type « prime-boost » avec essai « dose-ranging » sur le « boost »
Nombre de volontaires	180 (répartis en 10 groupes : 5 x 30 volontaires immunisés + 5 x 6 volontaires placebo)
Méthodologie	Essai multicentrique, comparatif, randomisé, en double aveugle versus placebo
Candidat vaccin	Canarypox recombinant ALVAC (vCP1452) : voir VAC10 LIPO-5 : voir VAC10 Placebo
Schéma de l'essai	Immunisation simple avec 500 µg de LIPO-5 ou 1 dose ALVAC à S0, S4, S12 et S24 ou immunisation type « prime-boost » avec 1 dose ALVAC à S0 et S4 puis en « boost », 500, 150 ou 50 µg de LIPO-5 à S12 et S24. Suivi jusqu'à M18.

ANRS VAC15

(phase I, promoteur ANRS, début de l'essai prévu : 1er trimestre 2004)

But	Évaluer la tolérance et l'immunogénicité de lipopeptides de 2 ^e génération. Ces lipopeptides ont été obtenus par un nouveau procédé de synthèse permettant la production à large échelle.
Nombre de volontaires	En cours de discussion
Méthodologie	Essai multicentrique
Candidat vaccin	LIPO-5 nouvelle formule
Schéma de l'essai	En cours de discussion

Ces essais concernent les formulations, les doses et les voies d'administration des lipopeptides, seuls ou en stratégie « prime boost » associés au vecteur Alvac.

■ **Les essais ANRS VAC10 et VAC12** permettent d'évaluer la toxicité et l'immunogénicité de nouvelles préparations de lipopeptides composées de peptides VIH-1 différents. Ils ont été conçus pour induire des réponses CD4 et CD8 puissantes. En effet, l'induction *in vivo* de CTL (CD8 +) nécessitant la stimulation concomitante

d'une réponse T helper-CD4, un épitope CD4 + de la toxine tétanique (TT) a été rajouté. Pour VAC10, un lipopeptide TT a été rajouté à la préparation vaccinale LIPO-5 alors que pour VAC12, le peptide TT est intégré de façon colinéaire à chaque lipopeptide d'intérêt. Ces essais sont terminés. L'analyse des données est en cours.

■ **L'essai ANRS VAC17** teste la réponse mémoire des sujets vaccinés de l'essai VAC10. L'analyse des données est en cours.

■ **L'essai ANRS VAC15** vise à évaluer la tolérance et l'immunogénicité d'une nouvelle formulation de lipopeptides, plus simple et moins onéreuse à produire que les précédentes.

■ **L'essai ANRS VAC16** a pour objectif de comparer les voies d'injection intradermique et intramusculaire en vue de déterminer la voie d'immunisation la plus efficace et/ou la moins consommatrice de vaccin.

■ **L'essai ANRS VAC18** a pour but de déterminer la dose minimale de lipopeptide qui permettra d'obtenir une immunisation optimale (essai de type « dose-ranging » avec LIPO-5).

■ **L'essai ANRS VAC19 / HVTN042** est conçu pour confirmer en aveugle et sur un grand nombre de volontaires américains, les résultats de l'essai VAC10 concernant le candidat vaccin LIPO-5. Ce lipopeptide est également testé en « boost » avec recherche d'un effet dose, l'Alvac vCP1452 étant utilisé en primo-immunisation.

Deux essais explorent l'immunité muqueuse et sont réalisés en 2003 :

■ **L'essai ANRS Pré-VAC14** évalue la faisabilité des techniques de prélèvements muqueux.

■ **L'essai ANRS VAC14** vise à étudier la voie muqueuse comme nouvelle voie d'immunisation contre le VIH-1 et les réponses immunitaires induites aux sites muqueux. La préparation vaccinale sera administrée chez des femmes volontaires par voie muqueuse nasale ou vaginale ; l'immunité muqueuse sera évaluée au niveau nasal, salivaire et vaginal.

Les perspectives

Les lipopeptides apparaissent aujourd'hui comme de bons candidats vaccins puisqu'ils montrent une bonne efficacité en termes de réponse cellulaire.

L'ANRS poursuivra des essais de phase I/II utilisant une stratégie de prime-boost associant des lipopeptides à des vecteurs viraux (MVA, adénovirus). Les équipes

soutenues par l'ANRS ont ainsi testé récemment des hypothèses originales concernant l'utilisation des lipopeptides combinés aux adénovirus. Ces derniers potentialisent la réponse immunitaire obtenue avec les lipopeptides (Molinier-Frenkel V., Lengagne R. et al. *J Viro*, 2002).

L'ANRS a également engagé une réflexion sur l'utilisation d'adjuvants de l'immunité cellulaire dans le but d'augmenter l'efficacité des lipopeptides. Cette stratégie permet d'envisager de nouveaux partenariats industriels. À l'horizon 2005, la priorité sera mise sur une combinaison MVA/lipopeptides prenant avantage de ce qu'il existe des MVA agréés pour les essais cliniques chez l'homme. Les essais de phase I/II seront poursuivis, en partenariat avec l'un des grands industriels du vaccin, jusqu'à ce que soit éventuellement prise une décision d'aller vers un essai d'efficacité à l'horizon 2008.

4

■ Le vaccin
thérapeutique

En parallèle aux recherches sur le vaccin préventif, l'ANRS s'est engagée dans une approche thérapeutique originale, la vaccinothérapie. Les résultats des premiers essais cliniques sont encourageants.

La vaccinothérapie (ou vaccin thérapeutique) consiste à utiliser des préparations vaccinales pour induire et amplifier les réponses immunitaires anti-VIH chez des patients infectés par le VIH afin d'obtenir un meilleur contrôle de la réplication virale par le système immunitaire. Cette approche de vaccinothérapie est envisagée en complément des traitements antirétroviraux. Elle pourrait permettre aux patients de bénéficier de périodes d'arrêts prolongés des traitements.

Trois essais de phase II ont été mis en œuvre par l'ANRS pour évaluer cette approche :

■ **L'essai VACCITER (ANRS 094)** a permis de tester l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité de l'Alvac (vCP1433, un canarypox recombiné exprimant des gènes du VIH) à contrôler la réplication virale chez des patients chroniquement infectés. Il a montré que l'injection du vaccin est sûre, capable de rappeler des réponses immunes spécifiques, et que la réplication virale est mieux contrôlée chez les patients vaccinés répondeurs.

■ **L'essai VACCIL-2 (ANRS 093)** a testé 3 injections de lipopeptides (LIPO-6T) associés à l'Alvac (vCP1433), suivies de 3 cures d'IL2 sous cutanée chez des patients en arrêt de traitement antirétroviral. Cet essai a montré que 25 % des patients vaccinés ont pu interrompre leur traitement pendant une durée médiane de 9 mois. Il a montré que les patients vaccinés exerçaient un meilleur contrôle sur la réplication du VIH après l'arrêt de traitement, et que cet effet est dû à l'induction d'une réponse polyépitopique soutenue contre le VIH.

■ **L'essai PRIMOVAC (ANRS 095)** évalue le même protocole de vaccination que celui de l'essai VACCIL-2 mais, cette fois, chez des patients traités par antirétroviraux précocement après la primo-infection. Cet essai est en cours.

D'autres essais sont en cours d'élaboration visant à associer des vecteurs viraux recombinants et des lipopeptides dans l'objectif d'obtenir un arrêt prolongé des antirétroviraux chez les patients infectés.



5

■ Le réseau
de recherches vaccinales

La recherche vaccinale de l'Agence est organisée dans le cadre d'un véritable réseau multidisciplinaire. Elle implique également des collaborations étroites avec des équipes étrangères, principalement aux Etats-Unis et au Canada, et des partenaires industriels.

Le Réseau Vaccinal Préventif

L'ANRS consacre environ 20 % de son budget pour mener à bien la réalisation du programme de recherche sur le vaccin. Elle a par ailleurs, mis en place un véritable réseau qui associe l'ensemble des acteurs et des structures concernés, de la recherche fondamentale à la recherche clinique (voir schéma page 64). Ce réseau permet de coordonner l'ensemble des projets scientifiques et d'organiser les recherches sur des thématiques complémentaires (chimie, immunologie, expérimentation animale). Il permet également aux équipes impliquées de bénéficier de plates-formes technologiques communes alimentées par les techniques mises au point par les laboratoires et de mettre en commun leurs ressources propres. Enfin, le réseau favorise l'innovation et l'adaptation des programmes grâce à un partage et une exploitation commune des données et des résultats obtenus.

Le Réseau Vaccinal Préventif s'organise autour de six axes principaux.

■ LA RECHERCHE PRÉ-CLINIQUE

Le Réseau Vaccinal Préventif associe des laboratoires impliqués dans quatre champs principaux de recherche :

- la conception des lipopeptides et l'étude des mécanismes rendant compte de leur immunogénicité,
- la conception des vecteurs recombinants,
- la mise au point de nouvelles techniques d'évaluation des réponses chez les sujets vaccinés,
- l'évaluation de l'impact de la variabilité virale sur la reconnaissance par les cellules T.

■ LES PLATES-FORMES D'ÉVALUATION DE L'IMMUNITÉ

L'évaluation des réponses immunitaires chez les volontaires vaccinés au cours des essais cliniques est réalisée dans trois sites, selon des protocoles harmonisés.

- La plate-forme « Immunologie cellulaire » évalue les réponses CD4 et CD8 chez les volontaires immunisés, par différentes techniques : prolifération des cellules T,

tests de cytolyse (CTL), Elispot CD8 + et CD4 + et marquage intracellulaire des cytokines (Institut Cochin, Paris, Hanne Gahéry).

■ La plate-forme « Immunologie anticorps » est tournée vers l'exploration de la spécificité des anticorps produits et de l'activité neutralisante des sérums des sujets vaccinés (INSERM U544, Strasbourg, Christiane Moog).

■ La plate-forme « Immunologie muqueuse » explore l'immunité muqueuse humorale en recourant à des techniques telles que la quantification des IgA et des IgG, l'analyse de leur spécificité et de leurs profils isotypiques, le test d'inhibition de transcytose du virus, et le test d'inhibition de transfert du virion des cellules dendritiques aux lymphocytes T (INSERM U430, Paris, Hakim Hocini).

■ LES CENTRES CLINIQUES

Six centres cliniques sont impliqués dans la recherche vaccinale de l'ANRS. Ils permettent le recrutement des volontaires et participent à la réalisation des essais vaccinaux. Trois centres sont implantés à Paris et trois en région (Nantes, Marseille et Toulouse).

■ L'AC28 ANRS « ESSAIS VACCINAUX PRÉVENTIFS »

Elle est chargée de l'évaluation des projets d'essais vaccinaux préventifs qui lui sont soumis au fur et à mesure de leur élaboration. Elle donne son accord au démarrage des essais. Depuis 2001, l'ANRS est promoteur de tous les essais vaccinaux élaborés dans le cadre de son programme vaccinal.

■ LE RÉSEAU DES VOLONTAIRES

La mise en place d'essais vaccinaux soulève la question du recrutement de volontaires pour y participer. Dès 1992, l'ANRS a constitué un comité pluridisciplinaire chargé de sélectionner les candidats. Ce comité réunit des représentants de l'ANRS, des cliniciens et des psychiatres/psychologues. Les personnes chez qui sont évalués les candidats vaccin doivent être séronégatives, ne pas être exposées aux risques de contamination, comprendre et accepter les risques associés à la recherche.

La procédure de sélection des candidats s'effectue en tenant compte de quatre risques principaux.

■ Un risque biologique. Il est possible que les préparations vaccinales testées induisent la production d'anticorps qui, en cas de contact avec le VIH, facilitent la contamination.

■ Un risque comportemental. Un volontaire qui se croirait indûment protégé par

un candidat vaccin pourrait adopter des comportements à risque de contamination par le VIH.

- Une contrainte psychologique. Les participants aux essais vaccinaux peuvent produire des anticorps anti-VIH. Ils sont dans une situation de « pseudo séropositivité » ou « séropositivité sans virus ». Un test de dépistage peut être positif alors qu'ils ne sont pas porteurs du virus.
- Une contrainte sociale. La situation de pseudo séropositivité peut, dans certaines situations, être contraignante (passage des frontières de certains pays, obtention d'une assurance pour une demande de prêt, par exemple).

La sélection s'effectue à partir d'un dossier écrit dans lequel les volontaires exposent leur motivation à participer aux essais, puis sur la base d'examens biologiques et d'entretiens avec un clinicien et un psychiatre ou un psychologue. Les volontaires ne sont pas rémunérés.

À ce jour, un peu plus de 600 personnes ont intégré le réseau des volontaires.

■ LA RECHERCHE DANS LES PAYS EN DÉVELOPPEMENT

La recherche dans les pays en développement est une des priorités de l'ANRS. C'est pourquoi l'Agence entend associer au programme vaccinal les pays dans lesquels des sites ANRS sont implantés. Des essais cliniques dans ces pays, en particulier en Côte d'Ivoire et au Sénégal, sont d'ores et déjà envisagés. Cette démarche s'inscrit dans la perspective de la réalisation de vastes essais de phase III destinés à évaluer l'efficacité de candidats vaccin.

Le programme vaccinal dans les pays en développement est principalement tourné vers le site d'Abidjan et comprend actuellement trois orientations principales :

- Un travail d'analyse des séquences virales présentes dans la population Ivoirienne. Les premières données indiquent que les séquences de Gag et Nef semblent bien conservées entre les souches AG, dominantes en Côte d'Ivoire, et B, dominantes en France.
- Une évaluation des réponses immunitaires destinée à déterminer si l'utilisation des lipopeptides conçus à partir de séquences de virus de sous-type B est pertinente dans des populations infectées par d'autres sous-types viraux.
- Une mise en place de l'infrastructure nécessaire au recrutement des volontaires et à la réalisation d'un futur essai clinique.

Les partenaires industriels

Le programme de recherche vaccinal s'appuie sur des partenariats avec des industriels. Pendant plus de dix ans, des conventions successives ont été établies entre l'Agence et Aventis-Pasteur. Cette collaboration avait pour objectif de mettre en place les programmes de développement clinique nécessaires à l'évolution des lipopeptides. Certains aspects de la recherche fondamentale poursuivie par Aventis-Pasteur ont également été financés par l'ANRS. Cela a notamment permis à cet industriel de développer les vecteurs recombinants (Alvac) utilisés à ce jour dans plusieurs des essais de phases II et III au niveau international.

Des partenariats avec d'autres industriels ont parallèlement été mis en place, tel que Biovector Therapeutics. Cela a permis d'accélérer le développement clinique des lipopeptides en diversifiant l'accès aux lots cliniques. Au moment où ce document est édité, l'ANRS se rapproche de nouveaux partenaires industriels, en particulier GSK.

Les collaborations internationales

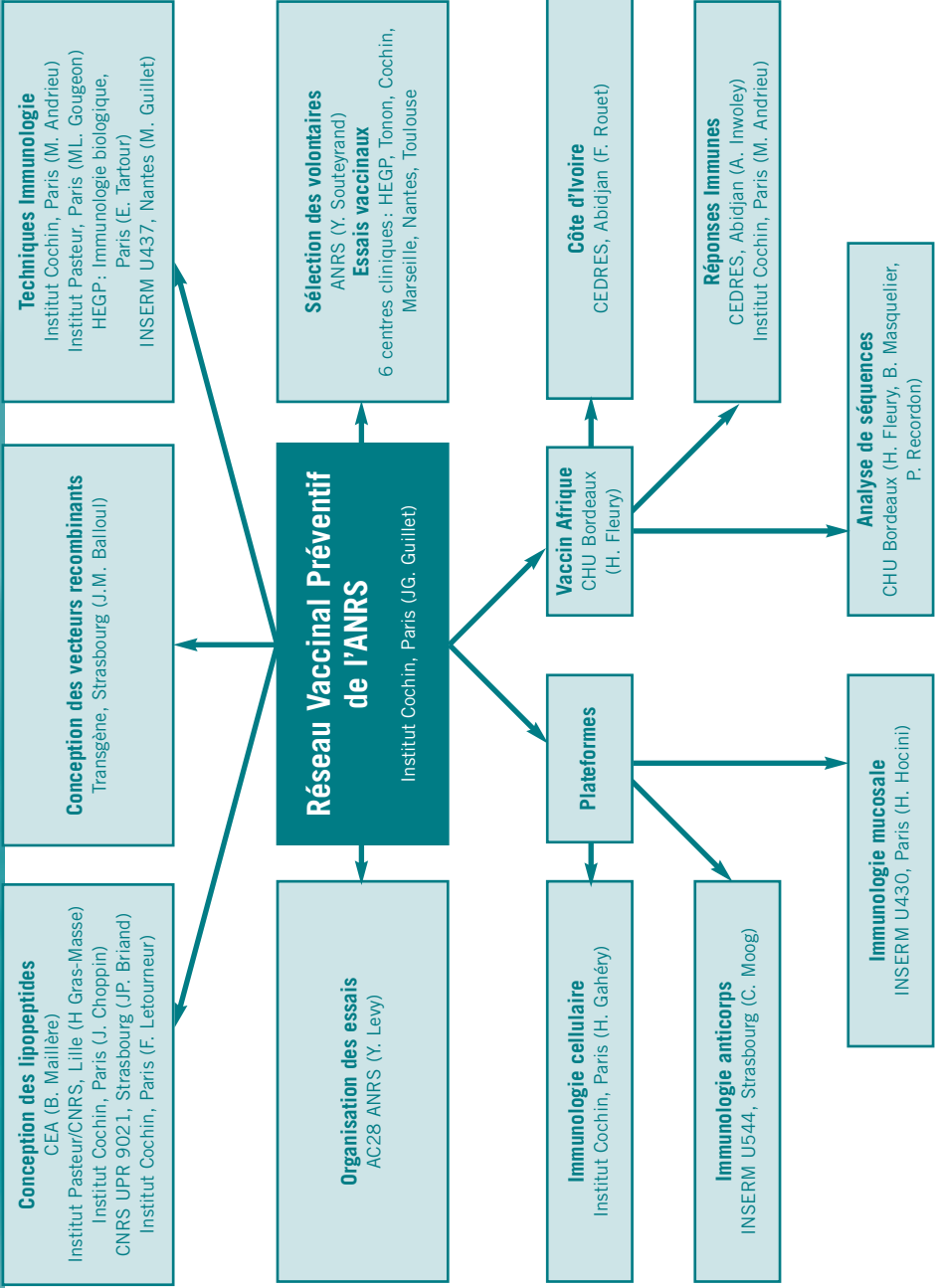
Les principales collaborations internationales mises en place dans le cadre du programme vaccinal de l'ANRS concernent des équipes américaines et canadiennes.

Les partenaires sont essentiellement :

■ Le HIV Vaccine Trial Network (HVTN) américain. La collaboration concerne notamment l'harmonisation des techniques immunologiques d'évaluation de l'immunité cellulaire, et des échanges de protocoles et de réactifs. Dans l'essai HVTN042/ANRS VAC19, l'évaluation des réponses immunitaires sera réalisée parallèlement aux Etats-Unis et en France.

■ Le Canvac, réseau canadien pour l'élaboration de vaccins et d'immunothérapies. La collaboration concerne l'immunité muqueuse et s'articule autour de trois axes :

- l'harmonisation des différentes méthodes de prélèvements muqueux,
- la définition des modalités pratiques de l'étude fonctionnelle des CTL d'origine muqueuse en périphérie,
- la comparaison et la mise en place des approches méthodologiques pour explorer la fonctionnalité des anticorps au niveau des muqueuses.





Anrs
research
on HIV
vaccine

anRS) Recherches sur/Research on

EDITORIAL BOARD

Elisabeth Fischer, *ANRS*

Jean-Gérard Guillet, *INSERM Unit 445*

Michel Kazatchkine, *ANRS*

Marie-Christine Simon, *ANRS*

SUBEDITING

Jennifer Daubanes

Morgane Nicolas

EDITING

RCP Communication

TRANSLATION

David Marsh

Document released by the Scientific Information and Communication Office

Design: Epilobe

Summary

- 1. Introduction** p.5
- 2. Multidisciplinary research** p.7
 - HIV preventive vaccine research
- 3. An original strategy: lipopeptides** p.11
 - Lipopeptides, application of the concept
 - Trials in animals
 - Trials in humans
 - The prospects
- 4. Therapeutic vaccines** p.23
- 3. The ANRS vaccine research network** p.25
 - The preventive vaccine network
 - The industrial partners
 - International collaborations
- References** p.65



Introduction

The HIV/AIDS epidemic is of unprecedented gravity and is spreading rapidly, notably in the disadvantaged regions of the world. The search for a preventive vaccine is an absolute priority if we hope to halt the spread of the epidemic.

The scale of the HIV/AIDS epidemic has exceeded the most pessimistic forecasts. Some 42 million people worldwide are currently estimated to be HIV-infected. Since the start of the epidemic, AIDS has caused over 25 million deaths. UNAIDS predicts that 70 million people could die of AIDS over the next twenty years in the 45 most affected countries.

The epidemic is growing apace in sub-Saharan Africa, the world's most affected continent, where in the short term it threatens the achievements of several decades of development. If better prevention and improved access to treatments are not achieved between now and 2010, AIDS will raise the death rate in Africa by 40%. The epidemic is also gaining ground fast in China and India, and has not spared Eastern Europe and Russia, Latin America or the Caribbean.

The epidemic has also not spared the rich countries, and there are 1.5 million HIV-infected people in the United States and Europe. The advent of antiretroviral multitherapies in the mid-1990s resulted in a two-thirds reduction in the mortality and morbidity associated with HIV infection. However, these treatments have limits: they do not eradicate the virus, are hampered by viral resistance, and are accompanied by disabling and/or serious adverse reactions. Moreover, their cost limits accessibility in most poor countries.

The status of the epidemic and its human, economic and social consequences, combined with the limits of current treatments and with their unavailability for most victims highlight the urgent need to prioritize HIV preventive vaccine research. Only an effective, safe, broad-spectrum and accessible vaccine will enable individual, primary prevention suited to a large-scale strategy and hence to stemming the epidemic.

For over 10 years the ANRS has been committed to an original research program on HIV vaccines, combining basic science and clinical research. One fifth of its budget—around 10 million US Dollars—is dedicated to the preventive vaccine research effort. This brochure presents the ANRS R&D strategy using lipopeptides.

Michel Kazatchkine
Director of the ANRS



2.

Multidisciplinary research

The HIV preventive vaccine research program run by the ANRS covers all experimental fields: upstream research for the definition of immunogens, animal research, and clinical research to evaluate candidate vaccines. At the same time the ANRS is developing a vaccine strategy based on the utilization of lipopeptides.

HIV preventive vaccine research

■ THE STATE OF RESEARCH INTO AN HIV PREVENTIVE VACCINE

In the mid-1980s, scientists focused from the outset on the induction of a humoral-mediated immune response by using the HIV-1 proteins most exposed to the immune system. The first immunogens used to produce antibodies able to neutralize the infection were recombinant envelope proteins obtained by genetic engineering to avoid any HIV contamination on vaccination. Despite encouraging results in the chimpanzee, researchers soon saw that this type of vaccine induced antibodies that were ineffective on the “wild” strains responsible for infections in man.

Researchers then sought to induce a cellular immune response. This type of immunity involves helper T lymphocytes (CD4 T) and cytotoxic T lymphocytes (CTL) (CD8 T). The utility of the cell-mediated responses has been largely documented in the experimental models of the infection in the monkey and in studies of primary HIV infection in man. The CTL response is directed against the structural (Env, Gag and Pol) and regulatory proteins (Tat, Rev and Nef) of HIV.

Most researchers in 2003 believe that it will be possible to obtain partial vaccine protection through the induction of a strong and multiepitopic cellular response. As for the humoral response, advances in terms of structure have been made in the understanding of the mechanisms of HIV entry into the cell, but it remains a distant goal. For this reason, the ANRS in its vaccine trials has developed a strategy aimed at inducing a cellular response, as in other strategies currently in clinical trials worldwide.

A vaccine of this type would be a partially effective, first-generation vaccine. It would not prevent the infection but would lower the viral load during the primary infection

and provide substantial individual benefit by creating a long asymptomatic period during disease progression. It could circumvent the use of antiretrovirals for several years in many infected individuals and in populations. What's more, by reducing mean viral load in the population, vaccination could reduce HIV transmissibility and therefore impact on public health.

Since its creation, the ANRS has prioritized research into a vaccine against HIV infection, thereby becoming one of the key international contributors to this field.

■ Upstream research

The studies supported by the ANRS relate in particular to:

- the development and comparison of new vaccine vectors
- the development of new immunogens
- the study of dendritic cells and of antigenic presentation
- the design and the evaluation of vaccine formulations that induce mucosal immunity
- the development of tests to explore the humoral and cellular immune responses.

■ Animal research

Simian models are used to evaluate new vaccine strategies. Trials have been designed to assess the efficacy of the new candidate vaccines, notably the induction of a lasting immune response and of protection against viral transmission by the mucosal or systemic routes.

Other trials are intended to enhance the efficacy of the vectors, to evaluate new types of adjuvants and recombinant proteins, or to test the efficacy of a therapeutic vaccination in infected animals treated by polychemotherapy.

The ANRS has also standardized experimental protocols and methods needed to monitor animals after vaccination and challenge, thereby enabling comparison of the efficacy of the vaccine approaches developed by the different teams.

■ Clinical research

The ANRS has set up phase I and II clinical trials to evaluate the safety and capacity of the candidate vaccines to induce an immune response.

Since 1992, 15 trials have been conducted under the aegis of the ANRS. The candidate vaccines tested were increasingly complex recombinant canarypox viruses (Alvac) containing sequences coding for certain viral proteins, utilized alone or combined with other immunogens (whole or truncated envelope proteins). The ANRS

has also been developing an original strategy based on the utilization of lipopeptides. These comprise synthetic fragments of viral proteins associated with lipids that facilitate the induction of a cellular immune response. Approaches combining Alvac and lipopeptides soon allowed assessment of the prime-boost strategy. This vaccination strategy amplifies the immune response by a two-step immunization: a primary immunization with a recombinant vaccine followed by a boost with the protein fractions of HIV.



3

■ An original strategy: lipopeptides

Since 1994, the ANRS has been developing an original vaccine strategy based on the utilization of lipopeptides and designed to induce a cell-mediated immune response.

The ANRS's vaccine strategy since 1994 has been aimed at inducing a multiepitopic cellular response by the administration of lipopeptides. Lipopeptides are hybrid molecules containing large synthetic fragments of viral proteins associated with a monopalmitoylated lipid chain, the two moieties being covalently bound. These synthetic constructs enhance immunogenicity without the use of an adjuvant. The lipid moiety enables better penetration of peptides into the antigen-presenting cells (dendritic cells), thereby promoting the cellular immune response.

The vaccine strategy of the ANRS has been built over the years by relying on the results of multidisciplinary research that harnesses the efforts of biologists and chemists.

■ Prerequisites

The idea of using short immunogenic peptide sequences from several HIV proteins to induce the specific cellular responses stems from work which goes back to the late 1980s. At this time, immunologists had elucidated the molecular basis of the phenomenon of restriction by the major histocompatibility complex (MHC). T lymphocytes recognize a foreign antigen when it is presented in the form of peptides at the surface of a cell in association with MHC molecules. The question then arises how an incalculable number of foreign proteins can form unique complexes with a very limited number of MHC molecules.

Between 1986 and 1987, researchers in the Department of Biology at MIT (Jean-Gérard Guillet) studied the recognition of different peptides by class II-restricted T-cells. Their work shows that several analogues of the initial peptide, but also peptides derived from other antigens, can competitively inhibit activation of T-cells by the initial peptide (Guillet J.G., Lai M.Z. et al. *Nature*, 1986). Based on these findings, Guillet et al. suggested a model in which all the antigens give rise to peptides that can bind to the same site on the MHC molecule. T-cell recognition of this site (which is presumed to be polymorphic), complexed with antigen, can explain self-selection in the thymus and MHC restriction.

In parallel, it was demonstrated for the first time at the Institut Cochin, in INSERM unit U152 (headed by Jean-Paul Lévy), that there is a physical association between

MHC class I molecules and antigenic peptides (Bouillot M., Choppin J. et al. *Nature*, 1989). This work was subsequently continued in the same institute in INSERM unit U445 (directed by Jean-Gérard Guillet). Using an assay which measures the binding of radiolabeled MHC class I molecules to peptides, the researchers showed that the antigenic peptides can bind to various class I molecules with different affinities. This work indicates that the quantitative differences in the peptide/MHC class I or class II interactions may influence the pattern of MHC restriction observed in vivo. Having confirmed the interaction of a large number of antigenic peptides with purified HLA class I molecules (Choppin J., Martinon F. et al. *J Exp Med*, 1990), it was shown that the binding to several MHC molecules depends on the length of the peptide but also on its charge and on the presence of hydrophobic residues. Lastly, it was found that the distribution of the epitopes recognized by the T cells is not random in the HIV proteins but that clusters can be observed in certain regions. These observations and results will form the basis of the vaccine strategy that the ANRS will develop.

From now on systematic studies of peptides from complete sequences of all the HIV proteins will be determined in order to map the polyepitopic domains able to constitute the best immunogens.

■ The selection of epitopes

In a series of original articles, research teams participating in an ANRS-supported network (see chapter 5) have described the use of binding/competition of peptides with HLA molecules to identify a series of polyepitopic regions of numerous HIV proteins (Choppin J., Martinon F. et al. *J Immunol*, 1991 a, b). The immunogenic character of these peptide fragments is verified by the induction of an immune response mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTL). Several domains identified in the central region of the Nef protein contain numerous multirestricted CD8 epitopes against which responses are found in 97% of the seropositive donors with a response against Nef protein (Culmann-Pencioli B., Lamhamedi-Cherradi S. et al. *J Virol*, 1994). Analysis of the variability of these Nef epitopes in patients reveals that certain mutations lead to a marked reduction in CTL activity and are responsible for failure of the immune response (Couillin I., Culmann-Penciolelli B. et al. *J Exp Med*, 1994).

In designing a vaccine strategy based on immunogenic peptides aimed at inducing a polyclonal CTL response, these studies indicate that it is necessary to design large peptide fragments containing clusters of epitopes which correspond to several

haplotypes. To avoid the risk of failure, it is necessary to select immunogenic epitopes in the most conserved regions of HIV. The peptide selection criteria are a strong affinity for class I molecules, the capacity to form a stable complex with these molecules, and the ability to induce CTL cytolytic activity.

The same type of work was then done by the group of Bernard Maillère in the Protein Engineering and Research Department at the CEA (the French Atomic Energy Commission). They mapped in HIV proteins CD4 epitopes that bind to class I MHC molecules. Regions containing the clusters of CD8 and CD4 epitopes for different haplotypes were identified and selected. These constructs were synthesized or inserted in different vectors to test their immunogenic potential in vivo.

Lipopeptides, application of the concept

The utilization of peptides in vaccine preparations is an alternative to recombinant vectors. The major advantages of a peptide vaccine are the specificity of the induced response and the low risk compared to vaccines containing inactivated or attenuated viruses. Another advantage of this approach is that it allows the immune response to be directed against subdominant T-cell epitopes. However, to be sufficiently immunogenic, the peptides must be injected with adjuvants, such as Freund's incomplete adjuvant. To avoid the utilization of adjuvants, the chemists André Tartar and Hélène Gras-Masse (CNRS and Institut Pasteur de Lille), in collaboration with the immunologists of the Inserm Unit U445, have proposed direct coupling of peptides with a simple lipid molecule. This is the origin of the concept of lipopeptides, which are peptides linked by their carboxy-terminal to the lipid moiety comprising a palmitoyl group.

A first in vivo study in mice demonstrated the immunogenic potential of lipopeptides (Martinon F., Gras-Masse H. et al. *J Immunol*, 1992). The authors of this work compared the capacity to induce cytolytic CTL responses of synthetic peptides and of simple lipopeptides containing the same immunodominant T-cell epitope of HIV-1 gp160. Whereas the free peptides were weakly immunogenic, lipopeptides induced strong primary CTL responses. Lipopeptides of 16 or 34 amino acids were both effective, suggesting that several epitopes might be included in a single construct. T-helper responses (activation of CD4 lymphocytes) and B-cell responses (production of antibodies) were also achieved. Thus a simple lipopeptide construct can induce a total immune response.

One mechanism was recently suggested for the induction of a T-cell response by the lipopeptides (Andrieu M., Dessouter J.F. et al. *J Virol*, 2003). To induce a cellular response, an antigen must be processed and presented at the surface of a dendritic cell, which is responsible for the primary stimulation of T lymphocytes. The lipid moiety of the lipopeptide enables effective entry of the molecule in dendritic cells. This entry is non-specific, and thus all dendritic cells can be activated unrestrictedly. After endocytosis, the different epitopes contained in the lipopeptide are presented in association with the MHC class I molecules by the dendritic cells to specific CD8 T lymphocytes. By using confocal microscopy to track the fate of labeled lipopeptides in dendritic cells, it has been observed that the cytoplasmic and endosomal pathways are used to lead to the presentation by MHC molecules.

Some aspects of this research have been patented, including:

- basic concept of the utilization of lipopeptides to obtain a cell-mediated immune response. Patented in the United States and in Europe.
- cellular responses induced by lipopeptides prepared by colinear synthesis.
- formulation of lipopeptides in micellar form.
- identification of CD8 epitopes in lipopeptides.
- identification of CD4 epitopes in lipopeptides.
- new process for production of lipopeptides.

This portfolio of patents belongs to French research bodies – CNRS, Inserm, CEA, Institut Pasteur de Lille – which have licensed them to companies.

Trials in animals

After the preliminary identification of regions rich in class I and class II HLA epitopes in HIV proteins, several lipopeptides were synthesized, each containing some thirty amino acids corresponding to immunogenic “agregotopes” derived from HIV proteins. Once mixed, the lipopeptides form micelles, which increases their solubility. These mixtures are evaluated in mice, under precise experimental conditions, for their capacity to induce a cytotoxic CD8 T cell response. Similarly, the selected constructs are then evaluated in the simian immunodeficiency virus (SIV) macaque model to verify their immunogenicity in the primate. The efficacy of the induced responses to control the disease can be tested after a challenge infection by a pathogenic virus.

Seven lipopeptides were synthesized, derived from known immunogenic regions of the SIV Nef and Gag proteins, and were injected in rhesus macaques. The animals presented specific and functional CTL responses detectable up to 10 months after the injection (Bourgault I., Chirat F. et al. *J Immunol*, 1994). Antibodies were also observed in all the animals. In another experiment, the lipopeptides were optimized by addition of a T-helper peptide of tetanus toxoid (TT), and induced a strong CD4 response that was correlated with the induction of a multiepitopic CD8 response (Mortara L., Gras-Masse H. et al. *J Virol*, 1999). After infectious challenge, the responding macaques controlled the viral load better than the others. The lipopeptides are thus able to induce B- and T-cell responses in the primate.

Trials in humans

The vaccine strategy based on lipopeptides has been evaluated in several trials set up by the ANRS. In most of these trials lipopeptides were combined with a viral vector in which are inserted genes that code for the same sequences as those that one finds in the lipopeptides. Hitherto, ANRS trials have used the canarypox vector (Alvac) which was developed by Aventis-Pasteur with ANRS support. In the trials to come, the ANRS will use other viral vectors, such as modified vaccinia Ankara (MVA) virus or adenovirus in the same type of strategy of combining a viral vector and lipopeptides.

Completed ANRS vaccine trials

Trial	Immunogens	Aim
ANRS VAC01 ¹	ALVAC (vCP125 ³) + rgp160	prime-boost immunization limited to the envelope
ANRS VAC02 ¹	rgp 160 + peptide V3	prime-boost immunization limited to the envelope analogous to the protective envelope in the chimpanzee
ANRS VAC03 ¹	ALVAC (vCP205 ⁴) + peptide CTLB-36 ⁵	prime-boost, 1st attempt at multiple immunization
ANRS VAC04 ²	6 lipopeptides (Env, Gag, Nef)	1st attempt at multiple immunization using a mixture of lipopeptides
ANRS VAC05 ¹	ALVAC (vCP125) or control ALVAC (vCP rage)	Study of memory response in the vaccinated subjects of trial VAC01

ANRS VAC06 ¹	ALVAC (vCP125) or control ALVAC (vCP rage)	Study of memory response in the vaccinated subjects of trial VAC02
ANRS VAC07 ¹	ALVAC (vCP3006)	1st attempt at multiple immunization containing CTL domains
ANRS VAC08 ¹	ALVAC (vCP205) or peptide CTLB-36	Study of memory response in the vaccinated subjects of trial VAC03
ANRS VAC09 ²	6 lipopeptides (Env, Gag, Nef)	Study of memory response in the vaccinated subjects of trials VAC03 and VAC07

¹: sponsored by Aventis-Pasteur; ²: sponsored by the ANRS; ³: expressing the protein Env (gp160); ⁴: expressing the proteins Env (gp120), Gag and Pro; ⁵: synthetic peptide comprising a T-helper epitope (p24) and a B-cell epitope (V3); ⁶: expressing the proteins Env (gp120), Gag, Pro and the CTL domains of the Pol and Nef proteins.

■ **ANRS VAC04** is a phase I trial in 28 healthy volunteers who received 3 injections of 6 lipopeptides. In terms of immune response parameters, the results are encouraging (Gahery-Segard H., Pialoux G. et al. *J Viro*, 2000; Pialoux G., Gahery-Segard H. et al. *Aids*, 2001), since it has been observed that:

- There were antibody responses in 90% of the subjects.
- There were anti-HIV CD4 responses in 80% of the subjects; they are multispecific.
- The cytotoxic anti-HIV CD8 responses tested by Elispot and in conventional cytotoxicity tests were clear, reproducible and multispecific in over half of the cases.
- Cytotoxic responses against Nef proteins derived from viruses different from the vaccine isolate were recorded in 3 of the 4 subjects tested, indicating immunization against conserved epitopes and suggesting a possible protection of the populations exposed to different HIV variants.

The lipopeptides therefore induce strong, lasting (over 2 years), multiepitopic and reproducible T-cell responses in a significant number of vaccinated subjects. The lipopeptides are well tolerated: the local and systemic reactions were weak and short-lived in these trials and similar to those induced by other candidate vaccines studied worldwide.

■ **ANRS Trial VAC09** is a study of memory response in which lipopeptides were used at booster doses in the volunteers of trials VAC03 and VAC07 who responded to a first vaccination comprising 3 to 5 injections of Alvac-HIV (vCP205 or vCP300). The results of this trial have shown that lipopeptides can induce a booster effect. This is an advantage compared with the recombinant vaccines Alvac and adenovirus,

which need increasingly high vaccine doses to avoid immunization against the vector.

In view of these promising results, the ANRS determined to pursue the phase I and II vaccine trials in healthy volunteers using lipopeptides. In the light of the results obtained, a decision will be taken regarding the realization of a phase III trial, which will be used to study the efficacy of this type of candidate vaccine in the population.

At least 8 phase I or II trials are under way or should begin in the next two years.

Ongoing ANRS vaccine trials

ANRS VAC10

(phase I, sponsor: Aventis-Pasteur, trial ended in January 2003)

Aim	To test a new mixture of lipopeptides to which can be added a lipopeptide bearing a T-helper epitope
Number of volunteers	60 volunteers (divided into 4 groups)
Methodology	Single-center, comparative, randomized, open trial
Candidate vaccine:	Recombinant canarypox ALVAC (vCP1452) expressing the envelope protein gp120 associated with the transmembrane part of gp41, Gag protein, the CTL domains of Nef and Pol. LIPO-5: mixture of 5 synthetic lipopeptides whose peptide sequences represent CTL epitopes contained in the HIV-1 proteins Gag (aa 17-35 + aa 253-284), Pol (aa 325-355) and Nef (aa 66-97 + 116-145). Each peptide is linked to monopalmitic acid via a lysine at the C-terminal end. LIPO-6T: LIPO-5 completed by a lipopeptide corresponding to a CD4 epitope of the tetanus toxin (aa 830-846).
Immunization regimen	5 injections at M0, M1, M3, M6 and M12 with vCP1452 or LIPO-5 or LIPO-6T or LIPO-6T + vCP1452 and follow-up till M24

ANRS VAC12

(phase I, sponsor: Biovector Therapeutics, trial ended in August 2002)

Aim	To test a new mixture where each lipopeptide is associated with a T-helper epitope
Number of volunteers	15
Methodology	Single-center, open trial

Candidate vaccine	LPHIV1: mixture of 4 synthetic lipopeptides whose peptide sequences are contained in the HIV-1 proteins Gag (aa 77-85), Pol-RT (aa 342-354), Pol (aa 476-484) and Nef (aa 62-82). Each peptide is colinearly associated with a T-helper epitope of the tetanus toxin (aa 830-843) which is linked to monopalmitic acid at the N-terminal end.
Immunization regimen	3 injections at M0, M1, M3 and follow-up till M12

ANRS VAC17

(phase I, sponsor: ANRS, trial ended in October 2002)

Aim	To test the memory response to lipopeptides in vaccinated subjects from trial VAC10
Number of volunteers	35: 25 from 4 groups of VAC10 and 10 naive for LIPO-6T antigens (control group).
Methodology	Single-center, comparative, open trial
Candidate vaccine	LIPO-6T: see VAC10
Immunization regimen	1 booster injection 16 to 18 months after M12 of VAC 10 and follow-up till M6

Planned ANRS vaccine trials

ANRS VAC16

(phase I, sponsor ANRS, trial planned to start in September 2003)

Aim	To determine which of the intradermal and intramuscular injection routes is the most effective in immunization and/or uses the least amount of vaccine
Number of volunteers	45 (divided into 2 groups)
Methodology	Multicenter, randomized, stratified, open trial
Candidate vaccine	LPHIV1: see VAC12
Immunization regimen	3 injections at W0, W4 and W12 by IM or ID route and follow-up till W24.

ANRS VAC18

(phase II, sponsor ANRS, trial planned to start in second half of 2003)

Aim	To determine the optimal minimum dose (dose-ranging study)
Number of volunteers	132 (divided into 4 groups)
Methodology	Multicenter, comparative, randomized, double-blind trial versus placebo

Candidate vaccine	LIPO-5: see VAC10 Placebo: diluent of LIPO-5, i.e. 5% glucose solution buffered in 20 mM Tris/HCl
Immunization regimen	4 injections at W0, W4, W12 and W24 with 500 or 150 or 50 or 0 µg of LIPO-5 and follow-up till W48.

ANRS VAC19 / HVTN042

(phase II, sponsor NIAID (USA), trial planned to start in late 2003)

Aim	To confirm on a larger scale in healthy US volunteers the results previously obtained with LIPO-5, by means of a prime-boost vaccine strategy with a dose-ranging study of the boost
Number of volunteers	180 (divided into 10 groups: 5 x 30 immunized volunteers + 5 x 6 placebo volunteers)
Methodology	Multicenter, comparative, randomized, double-blind trial versus placebo
Candidate vaccine	Recombinant canarypox ALVAC (vCP1452): see VAC10 LIPO-5: see VAC10 Placebo
Immunization regimen	Single immunization with 500 µg of LIPO-5 or 1 dose of ALVAC at W0, W4, W12 and W24 or prime-boost immunization with 1 dose of ALVAC at W0 and W4 then booster doses of 500, 150 or 50 µg of LIPO-5 at W12 and W24. Follow-up till M18.

ANRS VAC15

(phase I, sponsor ANRS, trial planned to start in first quarter of 2004)

Aim	To evaluate the safety and immunogenicity of second-generation lipopeptides. These lipopeptides were obtained by a new process of synthesis allowing large-scale production.
Number of volunteers	Under discussion
Methodology	Multicenter trial
Candidate vaccine	LIPO-5 new formula
Immunization regimen	Under discussion

These trials concern the formulations, doses and routes of administration of the lipopeptides, alone or combined with the vector Alvac in a prime-boost strategy.

■ **ANRS Trials VAC10 and VAC12** have evaluated the toxicity and immunogenicity of new preparations of lipopeptides comprising different HIV-1 peptides. The aim was to induce potent CD4 and CD8 responses. As the in vivo induction of CTL (CD8+) necessitates the concomitant stimulation of a CD4 T-helper response, a CD4+ epitope of the tetanus toxin (TT) was added. For VAC10, a TT lipopeptide was added to the LIPO-5 vaccine preparation, while for VAC12 the TT peptide was integrated colinearly to each lipopeptide of interest. These trials are finished. Data analysis is under way.

■ **ANRS Trial VAC17** tested the memory response of the vaccinated subjects of trial VAC10. Data analysis is under way.

■ **ANRS Trial VAC15** is evaluating the safety and immunogenicity of a new formulation of lipopeptides which is simpler and less costly to produce.

■ **ANRS Trial VAC16** is comparing the intradermal and intramuscular injection routes to determine which is the most effective in immunization and/or uses the least amount of vaccine.

■ **ANRS Trial VAC18** is determining the minimum lipopeptide dose that produces optimal immunization (dose-ranging study with LIPO-5).

■ **Trial ANRS VAC19 / HVTN042** is designed to confirm in a double-blind design and in a large number of American volunteers the results of trial VAC10 concerning candidate vaccine LIPO-5. This lipopeptide is also tested in a prime-boost vaccine strategy with a dose-ranging study of the boost, Alvac vCP1452 being used for the primary immunization.

Two trials exploring mucosal immunity are ongoing in 2003:

■ **ANRS Trial Pre-VAC14** is evaluating the feasibility and acceptance of mucosal sampling techniques.

■ **ANRS Trial VAC14** is designed to study the mucosa as a new HIV-1 immunization route and the immune responses induced at the mucosal sites. The vaccine preparation will be administered to female volunteers by the nasal or vaginal mucosal route. Mucosal immunity will be evaluated in the nose, saliva and vagina.

The prospects

Lipopeptides now appear as good candidate vaccines that effectively elicit cellular responses. The ANRS will pursue the phase I/II trials using a prime-boost strategy combining lipopeptides with viral vectors (MVA, adenovirus). Teams supported by the ANRS have recently tested original hypotheses concerning the utilization of lipopeptides combined with adenoviruses. The latter potentiate the immune response obtained with lipopeptides (Molinier-Frenkel V., Lengagne R. et al. *J Virol*, 2002). The ANRS has also been considering the utilization of adjuvants of cellular immunity so as to enhance the efficacy of the lipopeptides. This strategy means that new industrial partnerships can be envisaged. By the year 2005, the priority will be an MVA / lipopeptides combination taking advantage of the fact that some MVAs are already approved for human clinical trials. The phase I/II trials will be continued in partnership with one of the large vaccine companies, until a decision is taken to move towards an efficacy trial by the year 2008.



4.

Therapeutic vaccines

In parallel with its HIV preventive vaccine research, the ANRS has undertaken an original therapeutic approach, therapeutic vaccination. Encouraging results have emerged from the initial clinical trials.

Therapeutic vaccination (or use of a therapeutic vaccine) consists in utilizing vaccine preparations to induce and amplify the anti-HIV immune response of HIV-infected patients so as to achieve greater control over viral replication by the immune system. This approach is envisaged as a complement to antiretroviral treatments and could enable patients to have prolonged periods without treatment.

Three phase II trials have been launched by the ANRS to evaluate this approach:

■ **The VACCITER (ANRS 094)** trial has tested the safety, immunogenicity and efficacy of Alvac (vCP1433, a recombinant canarypox expressing HIV genes) in controlling viral replication in chronically infected patients. It has shown that injection of the vaccine is safe and boosts specific immune responses, and that viral replication is better controlled in responding vaccinated patients.

■ **The VACCIL-2 (ANRS 093)** trial has tested 3 injections of lipopeptides (LIPO-6T) combined with Alvac (vCP1433), followed by 3 subcutaneous injections of IL2 in patients who have stopped antiretroviral treatment. This trial has shown that 25% of the vaccinated patients were able to interrupt their treatment for a median period of 9 months. There was better control of HIV replication after discontinuation of treatment in vaccinated patients, due to induction of a sustained multi-epitopic response to HIV.

■ **The PRIMOVAC (ANRS 095)** trial is ongoing and is evaluating the same vaccination protocol as the VACCIL-2 trial, but this time in patients treated by antiretrovirals soon after primary infection.

Other trials are being set up aiming to combine recombinant viral vectors and lipopeptides so as to enable prolonged interruption of antiretrovirals in infected patients.



5

■ The ANRS
vaccine research network

The vaccine research of the ANRS is organized within a genuinely multidisciplinary network. It also involves close collaborations with overseas research teams, principally in the United States and Canada, and with industrial partners.

The Preventive Vaccine Network

The ANRS devotes approximately 20% of its budget to its vaccine research program, and has, moreover, set up a genuine network linking all the people and institutions concerned by basic to clinical research (see page 30). This network enables coordination of all scientific projects and organization of research on complementary topics (chemistry, immunology, animal experimentation). It also enables the research teams involved to share their own resources and to benefit from common technological platforms that are constantly updated with new techniques developed in the laboratories. The network promotes innovation and adaptation of programs through the sharing and common utilization of data and observations. The Preventive Vaccine Network is organized around six main themes.

■ PRECLINICAL RESEARCH

The Preventive Vaccine Network links laboratories involved in four main fields of research:

- the design of lipopeptides and the study of the mechanisms underlying their immunogenicity,
- the design of recombinant vectors,
- the development of new techniques to evaluate the response in vaccinated subjects,
- the evaluation of the impact of viral variability on T-cell recognition.

■ PLATFORMS FOR EVALUATION OF IMMUNITY

The immune response in volunteers vaccinated during clinical trials is being assessed at three sites, using standardized protocols.

- The “cellular immunology” platform is evaluating the CD4 and CD8 responses in immunized volunteers by various methods: T-cell proliferation, cytotoxicity tests (CTL), Elispot CD8+ and CD4+ and intracellular labeling of cytokines (Institut Cochin, Paris, Hanne Gahéry).

- The “antibody” platform is exploring the specificity of the antibodies produced and the neutralizing activity of the sera of vaccinated subjects (INSERM U544, Strasbourg, Christiane Moog).
- The “mucosal immunity” platform is investigating humoral mucosal immunity by means of techniques such as the quantification of IgA and IgG, analysis of their specificity and isotype profiles, the viral transcytosis inhibition test, and the test of inhibition of virion transfer from dendritic cells to T lymphocytes (INSERM U430, Paris, Hakim Hocini).

■ CLINICAL CENTERS

Six clinical centers are involved in the vaccine research of the ANRS. They recruit volunteers and participate in the vaccine trials. There are three centers in Paris and three elsewhere (Nantes, Marseille and Toulouse).

■ THE ANRS AC28 “PREVENTIVE VACCINE TRIALS”

This scientific committee is in charge of evaluating and approving preventive vaccine trial proposals. Since 2001, the ANRS has sponsored all the vaccine trials set up within the framework of its vaccine program.

■ THE NETWORK OF VOLUNTEERS

The setting up of vaccine trials is contingent upon recruitment of suitable volunteers. In 1992 the ANRS set up a multidisciplinary committee to select candidates. ANRS representatives, clinicians and psychiatrists/psychologists sit on this committee. The volunteers in whom the candidate vaccines are evaluated must be seronegative and not exposed to risks of contamination, and must understand and accept the risks associated with the research. The volunteer selection procedure takes into account the four main risks:

- A biological risk. The vaccine preparations tested may induce the production of antibodies which, in the case of contact with HIV, facilitate contamination.
- A behavioral risk. A volunteer who believes him/herself to be unduly protected by a candidate vaccine could adopt behaviors that heighten the risk of HIV contamination.
- A psychological pressure. Participants in vaccine trials may produce anti-HIV antibodies. They are in a situation of “pseudo-seropositivity” or “seropositivity without the virus”. A screening test may be positive even though they are not carrying the virus.

- A social pressure. The situation of pseudo-seropositivity may prove problematical in certain situations (crossing the borders of certain countries, for instance, or obtaining insurance when applying for a loan).

The selection is done based on a written file, in which the volunteers explain their reasons for wanting to participate in the trials, and then on the basis of laboratory test findings and the interviews with a clinician and a psychiatrist or psychologist. The volunteers are not paid. So far, just over 600 people have joined the network of volunteers.

■ RESEARCH IN THE DEVELOPING WORLD

Research in the developing countries is one of the priorities of the ANRS, which therefore intends to incorporate in its vaccine program those countries in which there are ANRS sites. Clinical trials in these countries, notably Ivory Coast and Senegal, are already planned. This initiative is part of the planned realization of vast phase III trials designed to evaluate the efficacy of candidate vaccines. The vaccine program in the developing countries is mainly centered on the Abidjan site and currently involves three principal lines of attack:

- Analysis of the viral sequences present in the Ivory Coast population. The first data indicate that the sequences of Gag and Nef seem to be well conserved between the AG strains, predominant in Ivory Coast, and the B strains, predominant in France.
- Evaluation of the immune response to determine whether the utilization of lipopeptides designed from sequences of the subtype B virus is relevant in populations infected by other viral subtypes.
- Setting up the infrastructure needed for recruitment of volunteers and for a future clinical trial.

The industrial partners

The vaccine research program is founded on collaborations with industrial partners. Over more than ten years, successive agreements were drawn up between the ANRS and Aventis-Pasteur in order to set up the clinical development programs necessary to progress in the use of lipopeptides. The ANRS has also financed certain aspects of the fundamental research pursued by Aventis-Pasteur. This collaboration has in particular enabled Aventis-Pasteur to develop the recombinant vectors (Alvac)

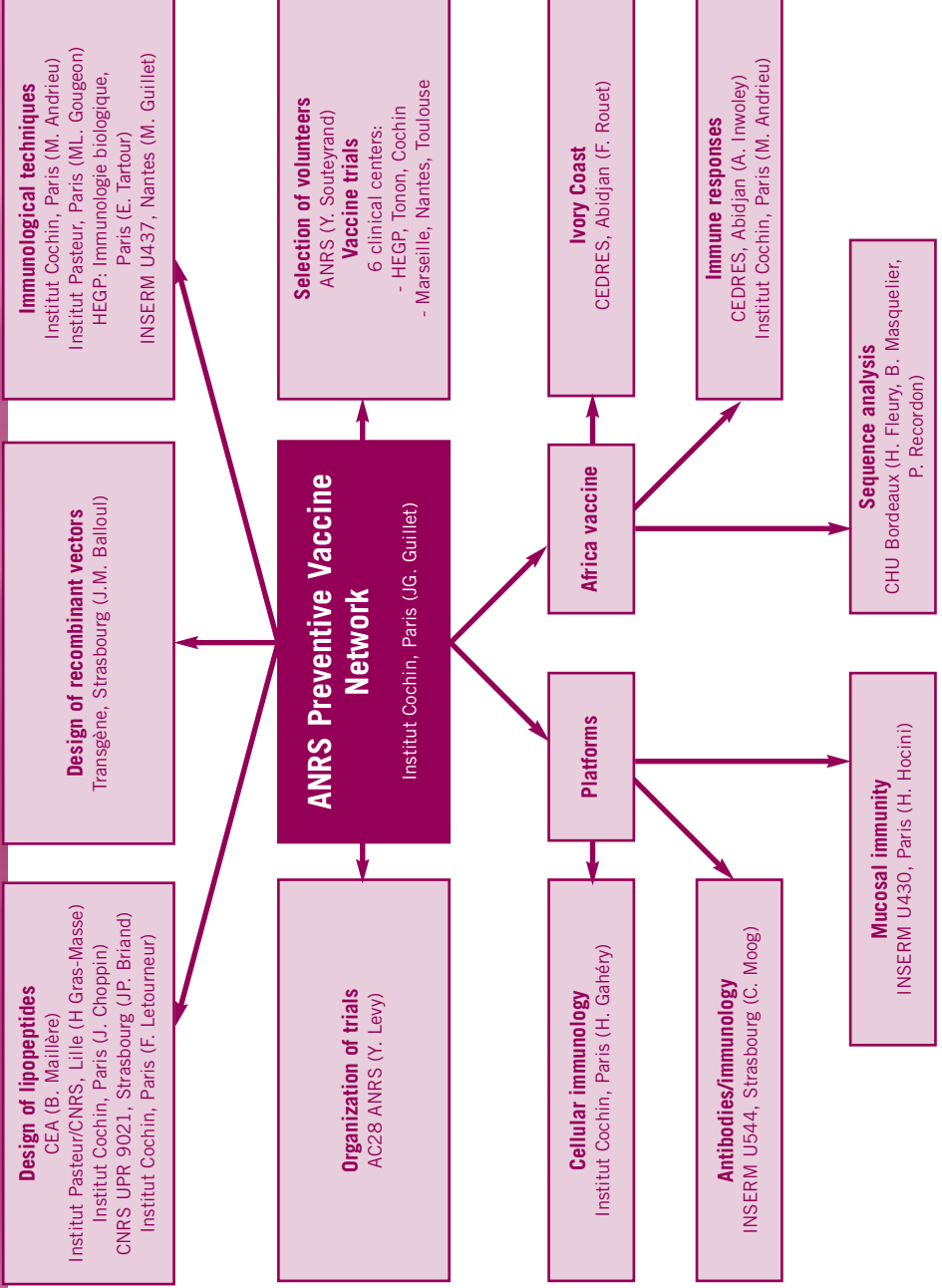
used today in several international phase II and III trials.

At the same time, partnerships have been forged with other companies, such as Biovector Therapeutics. This has accelerated the clinical development of lipopeptides by diversifying access to clinical batches. At the time of writing, the ANRS is engaged in talks with new industrial partners, in particular GSK.

International collaborations

The principal international collaborations established in the context of the ANRS vaccine program involve American and Canadian teams. The partners are essentially:

- The American HIV Vaccine Trial Network (HVTN). The collaboration relates notably to the standardization of immunological techniques used to evaluate cellular immunity, and to exchanges of protocols and reagents. In the HVTN042 / ANRS VAC19 trial, the evaluation of the immune response will be done in tandem in the United States and in France.
- Canvac, the Canadian network for the production of vaccines and immunotherapies. The collaboration concerns mucosal immunity and involves a three-pronged approach:
 - Standardization of the different methods of mucosal sampling.
 - Definition of the technical approaches to study function of CTL from mucosal origin.
 - Comparison and implementation of methodological approaches to explore the function of antibodies in mucous membranes.





R

ferences

Les principales publications sont accompagnées de leur abstract.
The main publications are accompanied by their abstracts.

1986. GUILLET J. G., LAI M. Z. ET AL. “Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens.” *Nature* 324(6094): 260-2.

■ *T lymphocytes require a foreign antigen to be presented on a cell surface in association with a self-transplantation antigen before they can recognize it effectively. This phenomenon is known as major histocompatibility complex (MHC) restriction. It is not clear how an incalculably large number of foreign proteins form unique complexes with a very limited number of MHC molecules. We studied the recognition properties of T cells specific for a peptide derived from bacteriophage lambda cI protein. Analogues of this peptide, as well as peptides derived from other unrelated antigens which can be presented in the context of the same MHC molecule, can competitively inhibit activation of these T cells by the cI peptide. Furthermore, these unrelated antigens can stimulate cI-specific T cells if certain specific amino-acid residues are replaced. Here we suggest a model in which all antigens give rise to peptides that can bind to the same site on the MHC molecule. T-cell recognition of this site (which is presumed to be polymorphic) with or without antigen bound can explain self-selection in the thymus and MHC restriction.*

1987. GUILLET J. G., LAI M. Z. ET AL. “Immunological self, nonself discrimination.” *Science* 235(4791): 865-70.

1989. BOUILLOT M., CHOPPIN J. ET AL. “Physical association between MHC class I molecules and immunogenic peptides.” *Nature* 339(6224): 473-5.

■ *Antigenic peptides are presented to T lymphocytes by major histocompatibility complex (MHC) molecules. The binding of peptides to MHC class II molecules has been demonstrated directly, and is found to correlate with the ability of specific class II alleles to restrict the T-cell response to specific peptides. By comparison, a direct demonstration of a physical association between antigenic peptides and MHC class I molecules has proved difficult. A recent report shows that*

it is possible, however, and the three-dimensional structure of a class I MHC molecule illustrates the site where such binding must occur. Here we describe a simple assay which measures the binding of radiolabelled MHC class I molecules to peptides bound to a solid phase support. We find that class I molecules bind specifically to peptides known to be antigenic for class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. Peptides which are recognized by cytotoxic T lymphocytes bind not only to the restricting MHC class I molecule but also to other class I molecules. Our results suggest that quantitative differences in the peptide/MHC class I interaction may influence the-pattern of MHC restriction observed in vivo.

1990. CHOPPIN J., MARTINON F. ET AL. "Analysis of physical interactions between peptides and HLA molecules and application to the detection of human immunodeficiency virus 1 antigenic peptides." *J Exp Med* 172(3): 889-99.

■ *The physical association of 40 antigenic peptides and purified HLA class I and class II molecules was monitored using a direct peptide binding assay (PBA) in solid phase and an inhibition peptide binding assay (IPBA) in which the competing peptide was present in a soluble phase. We also examined the ability of different peptides to inhibit the lytic activity of human antiviral cytolytic T cells towards cells incubated with the corresponding target peptide. Our results showed that: (a) Binding of a given human T cell-recognized peptide to several HLA class I and class II molecules occurred frequently. Nevertheless, preferential binding of peptides to their respective restriction molecules was also observed. (b) Binding of HLA molecules to peptides recognized by murine T cells occurred less frequently. (c) 11 of 24 (46%) randomly selected HIV-1 peptides contained agretopic residues allowing their binding to HLA molecules. (d) The kinetics of HLA/peptide association depended on the peptide tested and were faster than or similar to those reported for Ia molecules. Dissociation of these complexes was very low. (e) Peptide/HLA molecule binding was dependent on length, number of positive charges, and presence of hydrophobic residue in the peptide. (f) A correlation was demonstrated between a peptide inhibitory effect in the IPBA and its blocking effect in the cytolytic test. Our data indicated that the restriction phenomenon observed in T cell responses was not strictly related to either an elective HLA/peptide association, or a high binding capacity of a peptide to HLA molecules. These data also showed that the PBA and IPBA are appropriate for the detection of agretopic residues within HIV-1 proteins.*

1991 a. CHOPPIN J., MARTINON F. ET AL. "HLA-binding regions of HIV-1 proteins. I. Detection of seven HLA binding regions in the HIV-1 Nef protein." *J Immunol* 147(2): 569-74.

■ *The physical association of HLA class I or H-2 molecules with 36 HIV-1 Nef synthetic peptides was studied using a direct peptide binding assay (PBA) in solid phase. To assess the functional significance of the PBA results, the Nef peptides were also tested for their ability to inhibit the lytic activity of human or murine CTL. The PBA results showed that seven partly overlapping regions of the Nef protein contained MHC binding peptides (4-18, 46-67, 73-94, 100-128, 126-155, 182-198, and 192-206). Five of these seven regions included all the already described epitopes recognized by CD8+ human CTL. The two other regions, 4-18 and 46-67, are not yet described as antigenic for human CD8+ cells but they are located in the N-terminal part of Nef that was previously described as being stimulator for rat or chimpanzee CD4+ cells. Altogether, it can be concluded that 1) In virtually 100% of the cases, the PBA is capable to detect known antigenic peptides recognized by CTL. 2) The PBA and the functional inhibition assay provide similar results, supporting the functional significance of PBA results. 3) The PBA is easy to handle on a large scale, using multiple peptide and several MHC molecules, so that it can be used as a routine method for prevision of possibly epitopic sequences. 4) Systematic studies of peptides issued from the whole sequence of a given protein allow to map polyepitopic areas that are probably the most interesting parts of proteins for a vaccine purpose.*

1991 b. CHOPPIN J., MARTINON F. ET AL. "HLA-binding regions of HIV-1 proteins. II. A systematic study of viral proteins." *J Immunol* 147(2): 575-83.

■ *To detect HLA-binding peptides in 10 HIV-1 proteins (Rev, Tat, Vif, Vpr, Vpu, Gag p18, Gag p24, Gag p15, Env gp120 and Env gp41), the peptide binding assay (PBA) has been performed using three HLA class I molecules. Correlations have been searched between the PBA results and the peptide competitor activity in a functional test using HLA-A2-restricted CTL and target cells. A correlation between the data found in the PBA and well-defined CTL epitopes could be attempted only for the three Gag proteins. For these proteins, our results are in agreement with the known existence of epitopes reacting with human CD8+ CTL, with some exceptions. Together with the results reported with a panel of Nef peptides,*

these experiments showed that at least 18/20 of the already reported CTL epitopes from HIV-1 Gag, Nef, and Env proteins could be detected by the PBA, most (17/18) corresponding to strong reactivities. Perhaps more important, the regions of HIV-1 Gag p24 or Nef proteins that contain multiple associated CTL epitopes, with different HLA restrictions, were clearly identified by the reactivities in the PBA of several overlapping peptides and the major practical interest of the PBA might be the detection of such polyepitopic regions. Prediction are proposed in this report for 10 proteins, including several proteins for which CTL epitopes remain presently unknown.

1992. MARTINON F., GRAS-MASSE H. ET AL. “Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein.” *J Immunol* 149(10): 3416-22.

■ *In vivo priming of CTL requires the association with MHC class I molecules of peptides derived from the processing of endogenously produced proteins. Immunization with exogenous proteins or peptides rarely induces MHC class I-restricted CTL unless they are associated with lipidic compounds. The capacity to induce CTL was compared in synthetic peptides and simple lipopeptides containing the Immunodominant MHC class I H-2Dd-restricted T-cell epitope of HIV-1 gp160. In contrast with free peptides in saline, lipopeptides induced strong primary CTL responses in vivo. These CTL were able to lyse cells infected with a recombinant vaccinia virus expressing the HIV-1 env gene. Priming of CTL was also successful when using 16-amino acid lipopeptides as 34-amino acid lipopeptides, suggesting that several epitopes might be included in a single construct. In vivo priming of CTL also requires CD4+ T cell help. We therefore searched for Th cell activation after priming with lipopeptides. Our results show that, as with CTL induction, Th cell activation with lipopeptides did not require mixing with adjuvant. In addition, lipopeptides were also efficient at stimulating antibody-mediated responses. Our results show that a single lipopeptidic construct can induce a total immune response, which is of importance in vaccine development.*

1993. MARTINON F., KRISHNAN S. ET AL. “Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA.” *Eur J Immunol* 23(7): 1719-22.

1994. BOURGAULT I., CHIRAT F. ET AL. "Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. Induction in rhesus macaques of GAG- or NEF-specific cytotoxic T lymphocytes by lipopeptides."

J Immunol **152**(5): 2530-7.

■ *The protection against infection by HIV probably requires the induction of both neutralizing Abs and CTL responses. Vaccination by attenuated HIV is hardly acceptable and the use of viral genes inserted in recombinant living vectors needs further development, especially with respect to safety. The peptidic vaccination is a promising approach but free peptides are usually poorly immunogenic. Because potent immune responses have been obtained in mice with modified peptides such as lipopeptides, we have designed a study to assess the immunogenicity of lipopeptides in nonhuman primates. Seven lipopeptides were synthesized, derived from known immunogenic regions of the simian immunodeficiency virus (SIV) NEF and GAG proteins. Twelve rhesus macaques, randomly chosen and not selected on their MHC basis, were immunized subcutaneously with the seven lipopeptides in IFA. An MHC class I-restricted and CD(8+)-mediated CTL response has been observed in seven macaques directed against one or two of the synthetic immunizing peptides in each case. These CTLs were able to lyse autologous target cells infected with a recombinant vaccinia virus expressing the SIV nef or gag genes, suggesting that they recognized the naturally processed peptides. These activities are detectable in peripheral blood cells for at least 10 mo after the last immunization. Abs against the immunizing peptides have also been observed in all cases. This study demonstrates that lipopeptides can generate cytotoxic and humoral immune responses in a large number of unselected animals and this approach may thus be worth considering in the vaccination against HIV.*

1994. CONNAN F., HLAVAC F. ET AL. "A simple assay for detection of peptides promoting the assembly of HLA class I molecules."

Eur J Immunol **24**(3): 777-80.

1994. COUILLIN I., CULMANN-PENCIOLELLI B. ET AL. "Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 NEF protein."

J Exp Med **180**(3): 1129-34.

■ *Human immunodeficiency virus (HIV) induces strong responses from human*

histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class I-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL). In a previous report we identified an immunodominant region (amino acids 73-144) in the NEF protein that was recognized by CD8+ class I-restricted CTL of most asymptomatic individuals. Analysis of the 73-144 region by peptide sensitization, experiments using overlapping peptides corresponding to the LAI isolate identified the peptide sequences located between residues 73 and 82 or 84 and 92 and the peptide sequence between residues 134 and 144 as cognate peptides for HLA-A11- and HLA-B18-restricted epitopes, respectively. This report describes the variable demonstrable reactivities of CTL obtained from HLA-A11 or HLA-B18 seropositive, asymptomatic patients who all had a response to the virus NEF protein, but who did not always recognize appropriate cognate peptides. The high mutation rate of HIV probably facilitates the selection of mutants that can avoid the cellular immune response. We therefore analyzed the variability of these epitopes restricted by HLA-A11 and HLA-B18. We sequenced several viral isolates from HLA-A11 and HLA-B18 donors who recognized certain HLA-peptide complexes and from those who did not. A CTL sensitization assay was used to show that some mutations led to a great reduction in CTL activity in vitro. This might be due to failure of the mutated epitope to bind major histocompatibility complex class I molecule. A simple assay was used to detect peptides that promoted the assembly of class I molecules. Some of these mutations at major anchor positions prevented HLA-A11/peptide binding, and consequently impaired recognition of the HLA-peptide complex by the T cell receptor.

1994. CULMANN-PENCIOLELLI B., LAMHAMED-CHERRADI S. ET AL. "Identification of multirestricted immunodominant regions recognized by cytolytic T lymphocytes in the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein." *J Virol* 68(11): 7336-43.

■ *Peripheral blood mononuclear cells from a large number of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive donors were used to analyze the CD8+ T-cell response to each part of the Nef protein of HIV-1/LAI. This report identifies an immunodominant region (amino acids 73 to 144) in the Nef protein that was recognized by 97% of the NEF responder donors. This peptide sequence was dissected into four epitopic regions (amino acids 73 to 82, 83 to 97, 113 to 128, and 126 to 144), each of which was recognized under different HLA class I restrictions. Short overlapping peptides were used to sensitive the target cells for cytolysis and so to determine if these*

epitopic regions were multirestricted. Each region was found to contain several epitopes recognized with different HLA molecules. Thus, the central region of the Nef protein, a regulatory protein expressed early in HIV-infected cells, is rich in epitopic sequences which are found to be similar in many infected individuals and which can be recognized in association with at least ten HLA class I molecules. Their implications for the vaccination of humans with peptide sequences are discussed.

- 1995. **COUILLIN I., CONNAN F. ET AL.** "HLA-dependent variations in human immunodeficiency virus Nef protein alter peptide/HLA binding." *Eur J Immunol* 25(3): 728-32.
- 1995. **JUILLARD V., VILLEFROY P. ET AL.** "Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector." *Eur J Immunol* 25(12): 3467-73.
- 1995. **LAMHAMEDI-CHERRADI S., CULMANN-PENCIOLELLI B. ET AL.** "Different patterns of HIV-1-specific cytotoxic T-lymphocyte activity after primary infection." *Aids* 9(5): 421-6.
- 1995. **SAUZET J. P., DEPREZ B. ET AL.** "Long-lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced in vivo with chimeric-multirestricted lipopeptides." *Vaccine* 13(14): 1339-45.
- 1996. **DALOD M., FIORENTINO S. ET AL.** "Delayed virus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte activity in an HIV-infected individual with high CD4+ cell counts: correlations with various parameters of disease progression." *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(6): 497-506.
- 1996. **DEPREZ B., SAUZET J. P. ET AL.** "Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL." *Vaccine* 14(5): 375-82.
- 1996. **FIORENTINO S., DALOD M. ET AL.** "Predominant involvement of CD8+CD28- lymphocytes in human immunodeficiency virus-specific cytotoxic activity." *J Virol* 70(3): 2022-6.

- 1996. HLAVAC F., CONNAN F. ET AL. "Direct detection of peptide-dependent HLA variability by surface plasmon resonance." *Mol Immunol* 33(6): 573-82.
- 1996. SAUZET J. P., GRAS-MASSE H. ET AL. "Influence of strong CD4 epitope on long-term virus-specific cytotoxic T cell responses induced in vivo with peptides." *Int Immunol* 8(4): 457-65.
- 1997. GAHERY-SEGARD H., JUILLARD V. ET AL. "Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts." *Eur J Immunol* 27(3): 653-9.
- 1997. MEZIERE C., VIGUIER M. ET AL. "In vivo T helper cell response to retro-inverso peptidomimetics." *J Immunol* 159(7): 3230-7.
- 1998. GAHERY-SEGARD H., FARACE F. ET AL. "Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity." *J Virol* 72(3): 2388-97.
- 1998. MORTARA L., LETOURNEUR F. ET AL. "Selection of virus variants and emergence of virus escape mutants after immunization with an epitope vaccine." *J Virol* 72(2): 1403-10.
- 1998. ROMIEU R., BARATIN M. ET AL. "IFN-gamma-secreting Th cells regulate both the frequency and avidity of epitope-specific CD8+ T lymphocytes induced by peptide immunization: an ex vivo analysis." *Int Immunol* 10(9): 1273-9.
- 1998. SAUZET J. P., MOOG C. ET AL. "Adjuvant is required when using Env lipopeptide construct to induce HIV type 1-specific neutralizing antibody responses in mice in vivo." *AIDS Res Hum Retroviruses* 14(10): 901-9.

1999. CHASSIN D., ANDRIEU M. ET AL. "Dendritic cells transfected with the nef genes of HIV-1 primary isolates specifically activate cytotoxic T lymphocytes from seropositive subjects." *Eur J Immunol* 29(1): 196-202.
1999. DALOD M., DUPUIS M. ET AL. "Weak anti-HIV CD8(+) T-cell effector activity in HIV primary infection." *J Clin Invest* 104(10): 1431-9.
1999. DALOD M., DUPUIS M. ET AL. "Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy." *J Virol* 73(9): 7108-16.
1999. DALOD M., SINET M. ET AL. "Altered ex vivo balance between CD28+ and CD28- cells within HIV-specific CD8+ T cells of HIV-seropositive patients." *Eur J Immunol* 29(1): 38-44.
1999. LEVY Y., CAPITANT C. ET AL. "Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group." *Lancet* 353(9168): 1923-9.
1999. MARTINON F., MICHELET C. ET AL. "Persistent alterations in T-cell repertoire, cytokine and chemokine receptor gene expression after 1 year of highly active antiretroviral therapy." *Aids* 13(2): 185-94.
1999. MORTARA L., GRAS-MASSE H. ET AL. "Type 1 CD4(+) T-cell help is required for induction of antipeptide multispecific cytotoxic T lymphocytes by a lipopeptidic vaccine in rhesus macaques." *J Virol* 73(5): 4447-51.
- We have optimized the induction of antiviral cytotoxic T lymphocytes (CTL) in rhesus macaques by a lipopeptide vaccine containing seven peptides from simian immunodeficiency virus (SIV) Nef and Gag proteins and a strong T-helper peptide from tetanus toxoid (TT) that is promiscuous in humans (peptide TT 830-846). Two of the eight immunized macaques showed T-helper (Th) cell proliferation and a specific synthesis of gamma interferon in response to TT 830-846 peptide. They also showed multispecific cytotoxic activity against three to five of the immuni-

zing SIV peptides. These results show the importance of a strong specific type 1 Th response for inducing a multispecific CTL response in vivo, which is essential for the development of an anti-human immunodeficiency virus vaccine.

■ **2000. ANDRIEU M., LOING E. ET AL. “Endocytosis of an HIV-derived lipopeptide into human dendritic cells followed by class I-restricted CD8(+) T lymphocyte activation.” *Eur J Immunol* 30(11): 3256-65.**

■ **2000. GAHERY-SEGARD H., PIALOUX G. ET AL. “Multiepitopic B- and T-cell responses induced in humans by a human immunodeficiency virus type 1 lipopeptide vaccine.” *J Virol* 74(4): 1694-703.**

■ *We have attempted to develop an anti-human immunodeficiency virus (HIV) lipopeptide vaccine with several HIV-specific long peptides modified by C-terminal addition of a single palmitoyl chain. A mixture of six lipopeptides derived from regulatory or structural HIV-1 proteins (Nef, Gag, and Env) was prepared. A phase I study was conducted to evaluate immunogenicity and tolerance in lipopeptide vaccination of HIV-1-seronegative volunteers given three injections of either 100, 250, or 500 microg of each lipopeptide, with or without immunoadjuvant (QS21). This report analyzes in detail B- and T-cell responses induced by vaccination. The lipopeptide vaccine elicited strong and multiepitopic B- and T-cell responses. Vaccinated subjects produced specific immunoglobulin G antibodies that recognized the Nef and Gag proteins. After the third injection, helper CD4(+)-T-cell responses as well as specific cytotoxic CD8(+) T cells were also obtained. These CD8(+) T cells were able to recognize naturally processed viral proteins. Finally, specific gamma interferon-secreting CD8(+) T cells were also detected ex vivo.*

■ **2000. MOLINIER-FRENKEL V., GAHERY-SEGARD H. ET AL. “Immune response to recombinant adenovirus in humans: capsid components from viral input are targets for vector-specific cytotoxic T lymphocytes.” *J Virol* 74(16): 7678-82.**

■ **2000. MORTARA L., LETOURNEUR F. ET AL. “Temporal loss of Nef-epitope CTL recognition following macaque lipopeptide immunization and SIV challenge.” *Virology* 278(2): 551-61.**

2000. PARTIDOS C. D. "Peptide mimotopes as candidate vaccines." *Curr Opin Mol Ther* 2(1): 74-9.
2000. PARTIDOS C. D., AND KANELLOS T. S. "Epitope-based vaccines for viral diseases : from peptides to minigenes" *Res. Adv. In Virology* 1: 21
2001. BEIGNON A. S., BRIAND J. P. ET AL. "Immunization onto bare skin with heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* enhances immune responses to coadministered protein and peptide antigens and protects mice against lethal toxin challenge." *Immunology* 102(3): 344-51.
2001. CHOPPIN J., COHEN W. ET AL. "Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation." *J Immunol* 166(10): 6164-9.
2001. COUILLIN I., LETOURNEUR F. ET AL. "DNA vaccination of macaques with several different Nef sequences induces multispecific T cell responses." *Virology* 279(1): 136-45.
2001. HOSMALIN A., ANDRIEU M. ET AL. "Lipopeptide presentation pathway in dendritic cells." *Immunol Lett* 79(1-2): 97-100.
2001. PARTIDOS C. D., BEIGNON A. S. ET AL. "The bare skin and the nose as non-invasive routes for administering peptide vaccines." *Vaccine* 19(17-19): 2708-15.
2001. PIALOUX G., GAHERY-SEGARD H. ET AL. "Lipopeptides induce cell-mediated anti-HIV immune responses in seronegative volunteers." *Aids* 15(10): 1239-49.
- **OBJECTIVE:** Test the efficacy of a mixture of six NEF (N1, N2, N3), GAG (G1, G2) and ENV (E) lipopeptides in the induction of B- and T-cell anti-HIV responses. **DESIGN:** A randomized phase I open-label dose-finding trial. Twenty-eight healthy seronegative volunteers received the lipopeptides, with or without the adjuvant QS21. **METHODS:** Anti-HIV-peptide antibodies were detected by enzyme-linked

immunosorbent assay and Western blotting. Induction of cellular responses was assessed by proliferative test and (51)Cr-release assay. RESULTS: Local and systemic adverse reactions were always mild or moderate. After three injections an antibody response was detected in 25 out of 28 volunteers (89%). T cells from 19 (79%) of the 24 volunteers proliferated in response to at least one peptide. The majority of the volunteers had induced a multispecific proliferative response; that is, cells from volunteers proliferated to two (five of 19), three (five of 19), four (three of 19) or five peptides (one of 19). Cytotoxic responses by anti-HIV CD8+ lymphocytes could be tested in 24 volunteers, 13 (54%) of whom had clear and reproducible responses, with strong activity in the remaining 12 (> 20% of specific lysis), and polyepitopic responses were detected in at least seven of the 13 responders. Cytotoxic responses were found against the whole NEF protein (clade B LAI) in three of four tested volunteers and cross-reactions with the proteins of clade B (MN) and clade A (Bangui) HIV-1 strains, and also HIV-2 ROD, were detected in one of two tested volunteers. CONCLUSIONS: Lipopeptides are promising immunogens for an AIDS vaccine.

2002. BEIGNON A. S., BRIAND J. P. ET AL. “Immunization onto bare skin with synthetic peptides: immunomodulation with a CpG-containing oligodeoxynucleotide and effective priming of influenza virus-specific CD4+ T cells.” *Immunology* 105(2): 204-12.

2002. BEIGNON A. S., BRIAND J. P. ET AL. “The LTR72 mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* enhances the ability of peptide antigens to elicit CD4(+) T cells and secrete gamma interferon after coapplication onto bare skin.” *Infect Immun* 70(6): 3012-9.

2002. BEN-YEDIDIA T., BEIGNON A. S. ET AL. “A retro-inverso peptide analogue of influenza virus hemagglutinin B-cell epitope 91-108 induces a strong mucosal and systemic immune response and confers protection in mice after intranasal immunization.” *Mol Immunol* 39(5-6): 323-31.

2002. CASTELLI F. A., BUHOT C. ET AL. “HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity.” *J Immunol* 169(12): 6928-34.

2002. COHEN W. M., BIANCO A. ET AL. "Study of antigen-processing steps reveals preferences explaining differential biological outcomes of two HLA-A2-restricted immunodominant epitopes from human immunodeficiency virus type 1." *J Virol* **76**(20): 10219-25.
2002. LE GAL F. A., PREVOST-BLONDEL A. ET AL. "Lipopeptide-based melanoma cancer vaccine induced a strong MART-27-35-cytotoxic T lymphocyte response in a preclinical study." *Int J Cancer* **98**(2): 221-7.
2002. MERCIER S., GAHERY-SEGARD H. ET AL. "Distinct roles of adenovirus vector-transduced dendritic cells, myoblasts, and endothelial cells in mediating an immune response against a transgene product." *J Virol* **76**(6): 2899-911.
2002. MOLINIER-FRENKEL V., LENGAGNE R. ET AL. "Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response." *J Virol* **76**(1): 127-35.

■ *The capacity of recombinant adenoviruses (rAd) to induce immunization against their transgene products has been well documented. In the present study, we evaluated the vaccinal adjuvant role of rAd independently of its vector function. BALB/c mice received one subcutaneous injection of a mixture of six lipopeptides (LP6) used as a model immunogen, along with AdE1 degrees (10⁹) particles), a first-generation rAd empty vector. Although coinjected with a suboptimal dose of lipopeptides, AdE1 degrees significantly improved the effectiveness of the vaccination, even in the absence of booster immunization. In contrast to mice that received LP6 alone or LP6 plus a mock adjuvant, mice injected with AdE1 degrees plus LP6 developed both a polyspecific T-helper type 1 response and an effector CD8 T-cell response specific to at least two class I-restricted epitopes. The helper response was still observed when immunization was performed using LP6 plus a mixture of soluble capsid components released from detergent-disrupted virions. When mice were immunized with LP6 and each individual capsid component, i.e., hexon, penton base, or fiber, the results obtained suggested that hexon protein was responsible for the adjuvant effect exerted by disrupted Ad particles on the helper response to the immunogen. Our results thus have some important implications not only in vaccinology but also for gene therapy using rAd vectors.*

2002. **PARTIDOS C. D., BEIGNON A.-S. ET AL.** “Applying peptide antigens onto bare skin: induction of humoral and cellular immune responses and potential for vaccination.” *J Control Release* **85**(1-3): 27-34.

2003. **ANDRIEU M., DESOUTTER J. F. ET AL.** “Two human immunodeficiency virus vaccinal lipopeptides follow different cross-presentation pathways in human dendritic cells.” *J Virol* **77**(2): 1564-70.

■ *An efficient vaccine against human immunodeficiency virus (HIV) must induce good cellular immune responses. To do this, it must be processed and presented by dendritic cells, which are required for primary T-lymphocyte stimulation. We have previously shown that a model lipopeptide containing a short epitopic peptide from HIV-1 was endocytosed and presented in association with major histocompatibility complex class I molecules by human dendritic cells to specific CD8(+) T lymphocytes, but the cross-presentation pathway needed to be precisely determined. We have studied a longer lipopeptide (Pol(461-484)) and another lipopeptide (Nef(66-97)) currently being used in vaccine trials. Like the shorter lipopeptide, the rhodamine-labeled Pol(461-484) lipopeptide was internalized by endocytosis, as assessed by confocal microscopy. The lipopeptides were processed by dendritic cells and presented to CD8(+) T cells specific for the HLA-A*0201-restricted Pol(476-484) and the HLA-A*0301-restricted Nef(73-82) epitope, respectively. Presentation of both lipopeptides was inhibited by brefeldin A. Presentation of the Pol lipopeptide was inhibited by epoxomicin, a proteasome-specific inhibitor, but not by monensin. This shows that it gained access to the cytosol to be digested by the proteasome. In contrast, presentation of the Nef lipopeptide was not inhibited by epoxomicin but was inhibited by monensin, a classical inhibitor of acid-dependent endosomal enzyme activity, indicating an endocytic processing pathway yielding to major histocompatibility complex class I-restricted presentation. Therefore, the two lipopeptides followed different cross-presentation pathways, both resulting in efficient presentation to CD8(+) T lymphocytes.*

2003. **OGATA K., JARAMILLO A. ET AL.** “Automatic sequence design of major histocompatibility complex class I binding peptides impairing CD8+ T cell recognition.” *J Biol Chem* **278**(2): 1281-90.

- I 2003. PARTIDOS C. D., BEIGNON A.-S. ET AL. “Immunity under the skin: potential application for topical delivery of vaccines.” *Vaccine* 21(7-8): 776-80
- I 2003. SEIFERT U., MARAÑÓN C. ET AL. “An essential role of tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope.” *Nature Immunology* 4(4): 375-9

■ Une agence
de recherche
pour lutter
contre le VIH/sida
et les hépatites

■ *A governmental
research agency
for HIV/AIDS
and hepatitis*

anRS

**Agence nationale
de recherches sur le sida**

*National agency
for AIDS research*

101, rue de Tolbiac 75013 Paris
Tél. : 33 (0)1 53 94 60 00
Fax : 33 (0)1 53 94 60 01
www.anrs.fr