

gen 2000 4329

50376
1997
h37

THESE
PRESENTEE
A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT
EN CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE
PAR
Benoit DEPREZ

*BIBLIOTHEQUES COMBINATOIRES :
PREPARATIONS ET UTILISATIONS EN
PHARMACOCHEMIE ET EN
IMMUNOLOGIE*

SOUTENUE LE : 12/05/97

JURY :
PR A. TARTAR
PR J. MARTINEZ
DR J.G. GUILLET
PR F. WALLART
PR. H. GRAS-MASSE



Remerciements.

Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille, au sein du laboratoire de Chimie des Biomolécules dirigé par le Pr. André Tartar, en collaboration avec le Centre de Recherche France des laboratoires GlaxoWellcome aux Ulis.

Une partie importante des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, consacrée à la conception et la synthèse de lipopeptides à visée vaccinale a été réalisée en collaboration avec le laboratoire d'immunologie dirigé par Mr. Jean-Gérard Guillet, à l'Institut Cochin de Génétique Moléculaire.

Le stage doctoral a fait l'objet d'une bourse cofinancée par l'Institut Pasteur de Lille et la Région Nord-Pas-de-Calais.

Je prie Monsieur Tartar de bien vouloir accepter l'expression de ma reconnaissance, pour m'avoir accueilli, encadré, encouragé, et supporté depuis 7 ans !

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à Monsieur Jean Martinez d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Gérard Guillet de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ces travaux en acceptant d'en être rapporteur.

Je remercie également Monsieur Francis Wallart de bien vouloir les juger.

Hélène, tu m'as donné les enseignements des premiers jours, les plus importants. Merci.

Xavier, je te remercie pour la confiance, l'enthousiasme et la ferveur dont tu as fait preuve en travaillant avec moi. Tu as toujours été présent, efficace et fiable.

Christophe, je te remercie pour les conseils et l'aide que tu m'as donnés durant mes premières années de thèse.

Merci à vous toutes et tous,

Line,
Iuliana,
Marie,
Valérie,
Dragos,

pour la foi en la chimie combinatoire que vous avez entretenue, et sans laquelle rien ne serait comme aujourd'hui.

Anick,
Patricia,
Luc,
Christelle,
Romuald,
Rébecca,
Béatrice,
Christophe,
Stéphanie,

Jean-Claude,
Jamila,
Hervé,
Eric,

et tous les membres du SCBM.

Sans vous cette thèse n'aurait jamais, mais alors jamais, été soutenue.

Préambule

Les résultats que nous présentons dans ce mémoire ne constituent qu'une partie des travaux que nous avons réalisés depuis le début de notre travail doctoral. S'inscrivant dans le cadre des recherches sur les approches vaccinales contre le virus du Sida menées au sein du service de chimie des biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille en collaboration avec l'Institut Cochin de Génétique Moléculaire, nos premiers travaux ont porté sur la synthèse de lipopeptides. Cette stratégie visait à développer une réponse cellulaire T cytotoxique au moyen de peptides modifiés. Quel que soit le succès de cette approche, il est peu probable qu'un vaccin contre le VIH puisse ne faire appel qu'à un des composants de la réponse immune. Cette constatation avait conduit notre groupe à s'intéresser à la possibilité de déclencher une réponse humorale grâce à des peptides dérivés de la glycoprotéine d'enveloppe. Si les moyens d'améliorer l'immunogénicité de ces peptides ne manquent pas, le principal obstacle résidait dans l'extraordinaire variabilité des épitopes protecteurs du VIH. Une solution possible à ce problème consistait à faire appel aux techniques de synthèse combinatoire pour engendrer très rapidement de grandes séries de variants structuraux proches : les « mixotopes ». C'est à cette occasion que nous avons pu nous initier aux approches combinatoires. Très vite, le formidable potentiel de cette méthode pour engendrer des composés de grande diversité structurale s'est confirmée et nous a amenés à en envisager l'application à un domaine totalement différent, celui de la pharmacologie. De la première bibliothèque préparée dans cette optique en collaboration avec Xavier Williard et Line Bourel, qui devait constituer le dernier chapitre de cette thèse, est issu un accord de collaboration avec la firme Glaxo qui devait déboucher quelques années plus tard sur la création du département de chimie combinatoire de la société Cerep.

Trouver une présentation commune à ces différents sujets relevait de la gageure, aussi avons nous choisi de ne traiter dans ce mémoire que des aspects combinatoires de notre travail.

Les articles décrivant les recherches portant sur la réponse immune médiée par les lymphocytes T et en particulier sur les lipopeptides ont été regroupés en fin de ce manuscrit mais n'ont pas été commentés :

1-Immunisation of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant.

Frédéric Martinon, Hélène Gras-Masse, Christophe Boutillon, Frédéric Chirat, Benoît Déprez, Jean-Gérard Guillet, Elisabeth Gomard, André Tartar and Jean-Paul Lévy. *Journal of Immunology*, 1992, 149 p3416-3422.

2- Pimelautide and Trimexautide as Built-in Adjuvants Associated with an HIV-1 Derived Peptide : Synthesis and *in vivo* Induction of Antibody and virus-Specific Cytotoxic Lymphocyte-Mediated Response.

Benoît Déprez, Hélène Gras-Masse, Frédéric Martinon, Elisabeth Gomard, Jean-Paul Lévy and André Tartar. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995, 38, p459-465.

3- Long lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced *in vivo* with chimerical mutirestricted lipopeptides.

Jean-Pierre Sauzet, Benoit Déprez, Frédéric Martinon, Jean-Gérard Guillet, Hélène Gras-Masse and Elisabeth Gomard, *Vaccine*, 1995 Vol 13, N°14 p 1339-1345.

4- Mutations in residue 61 of H-Ras p21 protein influence MHC class II presentation.

Nicole Ngo-Giang-Huong Michèle Kayibanda, Benoit Déprez, Jean-Paul Lévy, Jean-Gérard Guillet, and Anne Françoise Tilkin. *International Immunology*, 1995 Vol 7, N°2, p269-275.

5- Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for *in vivo* induction of virus-specific CTL.

Benoît Déprez, Jean-Pierre Sauzet, Christophe Boutillon, Frédéric Martinon, André Tartar, Christian Serghereart, Jean-Gérard Guillet, and Hélène Gras-Masse. *Vaccine* 1996, Vol 14 N°5, p375-382.

Sommaire

I- Synthèse combinatoire. Principes généraux.

I-1- Introduction

I-2- Activités biologiques, notions de divergence et de convergence

A - Recherche d'un composé actif

B - Recherche d'un mélange actif

II- Bibliothèques Divergentes. Découverte de nouveaux médicaments.

II-1- La découverte d'une tête de série, pierre angulaire de la recherche pharmaceutique

A - Les stratégies de la découverte

B- Le criblage systématique à haut débit

C- Méthodes de décodage et déconvolution utilisées en synthèse divergente

II-2- Bibliothèques orthogonales : une nouvelle méthode d'identification des composés actifs.

A - Analyse critique des méthodes existantes

B - Principe général de la partition orthogonale

C - Conception d'une bibliothèque de 15625 tripeptides adaptée à la stratégie des répartitions orthogonales.

D - Préparation de la bibliothèque. Synthèses.

E - Criblage biologique.

F - Nouvelles directions.

II-3- Conclusion

III- Bibliothèques Convergentes, Monofonctionnelles. Utilisation comme immunogènes de synthèse.

III-1- Introduction.

III- 2- Le concept de Mixotope.

A - Conception d'une stratégie combinatoire destiné à élargir la réponse humorale spécifique.

B - Conception et Synthèse du Mixotope

C - Résultats biologiques.

III-2- Complexité et Diversité. Existe-t-il une limite à la complexité des Mixotopes?

A - Généralité du concept de Mixotope.

B - Conception et Synthèses.

C - Résultats biologiques

IV - Partie Expérimentale

V - Conclusion générale & Glossaire

I - SYNTHÈSE COMBINATOIRE. PRINCIPES GÉNÉRAUX.

I-1- Introduction.

La chimie de synthèse classique suit une démarche expérimentale bien codifiée. A la réaction chimique mettant en jeu un représentant de chacune des classes réactives (A1, B1...) font suite des étapes de purification et d'identification structurale du ou des produits de la réaction.

Une tradition était jusqu'à récemment bien établie de n'entreprendre l'évaluation biologique d'un produit que lorsque l'échantillon avait subi un ensemble bien codifié d'analyses de pureté et de confirmations de structure.

On pouvait opposer cette démarche à celle des chimistes des produits naturels dont le point de départ a toujours été un mélange complexe actif et l'issue, une série d'analyses permettant l'isolement d'un produit actif au sein du mélange et son élucidation structurale.

Ce n'est que très récemment que les chimistes de synthèse ont rapidement pris conscience de leur capacité à engendrer rapidement des mélanges de composés organiques au moyen de la chimie dite combinatoire et de l'intérêt de cette démarche dans la découverte de nouveaux médicaments.

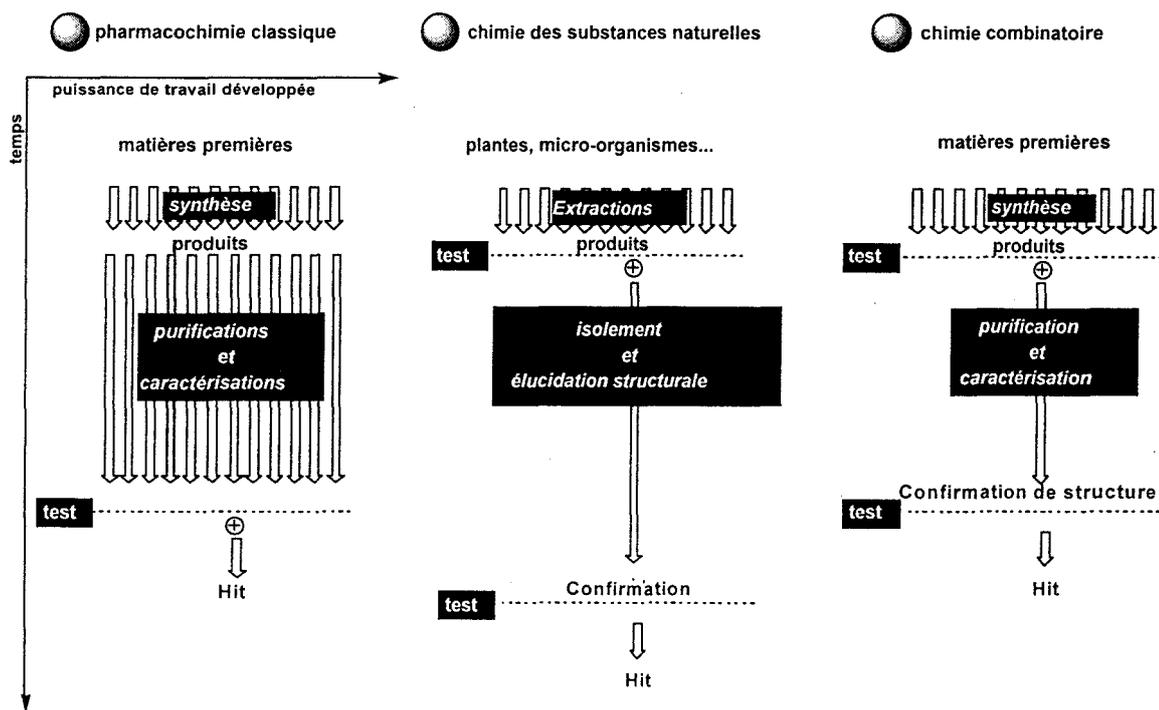


Figure 1. Comparaison des différents processus de découverte de nouvelles substances actives.

Ce concept a connu un développement extrêmement rapide au cours des quatre dernières années. Les voies explorées sont à ce point nombreuses et variées qu'il est devenu difficile de donner une définition exacte de la synthèse combinatoire.

Toutes ces démarches ont en commun d'engendrer un grand nombre de composés chimiques différents en synthétisant de façon systématique toutes les combinaisons possibles de plusieurs familles de monomères.

Par exemple, en partant de 10 acides et de 10 amines, on peut synthétiser 100 amides « combinatoires » différents comme indiqué dans la figure 2.

De par la bonne maîtrise de leur synthèse récurrente, les premières bibliothèques étaient de nature peptidique, pseudopeptidique, ou oligonucléotidique.

L'inconvénient de ces bibliothèques dérivées de polymères naturels est la mauvaise biodisponibilité de leurs constituants. La réponse des chimistes à cet inconvénient a été de s'orienter vers la synthèse combinatoire de petites molécules organiques. Il a fallu néanmoins se rendre à l'évidence suivante. Si la synthèse peptidique ou oligonucléotidique, fruit de dizaines d'années d'optimisation avait pu se prêter à la synthèse en mélange, ce n'était malheureusement pas le cas pour la plupart des autres réactions de la chimie organique, ne serait-ce que par l'éventail plus large de leur vitesses de réaction.

La solution fut de conserver de la stratégie de la synthèse combinatoire le principe d'engendrer un grand nombre de composés par combinaison de plusieurs séries de monomères, mais de réaliser chaque réaction séparément des autres, stratégie connue sous le nom de synthèse parallèle. Cette stratégie extensive n'est possible que grâce à une automatisation et une informatisation poussées des protocoles, telles que nous les avons mises en œuvre au laboratoire.

I-2- Activité biologique de ces bibliothèques, notion de convergence et de divergence.

Il est nécessaire de développer ici une notion que nous cherchons à introduire de manière systématique dans l'évaluation des stratégies combinatoires : la convergence (ou son contraire la divergence) d'une bibliothèque de composés. Cette notion se définit par rapport à une activité biologique donnée et une même bibliothèque pourra être convergente pour un test, et divergente pour un autre. Selon cette terminologie, une bibliothèque sera dite totalement divergente si l'activité de cette bibliothèque est due à exclusivement à un seul de ses constituants. A l'opposé, une bibliothèque sera dite totalement convergente si tous ses

constituants sont doués d'une activité similaire (si l'on pousse le raisonnement jusqu'au bout, tous ses composants sont identiques et il s'agit alors d'un échantillon de produit chimique purifié !), et contribuent de façon égale à l'activité du mélange. Ceci nous amène à la différence fondamentale entre la diversité et la similitude, qui ne sont pas simplement des antonymes : en effet, autant la diversité n'a pas de limite finie, autant la similitude, elle possède une limite connue qui est l'identité. Etre ou ne pas être, telle est la question!

Cette notion floue est bien entendue différente pour chaque récepteur. Une distinction importante entre ces deux types de bibliothèque est que le potentiel d'une bibliothèque divergente est directement proportionnel à sa complexité (c'est-à-dire le nombre d'entités structurellement différentes qui la composent) alors qu'à l'opposé, l'activité d'une bibliothèque convergente dépend peu de sa complexité. Dans la pratique, toute bibliothèque se situe entre ces deux limites et l'on cherchera à se rapprocher de l'une ou l'autre en fonction du but poursuivi.

A - Recherche d'un composé actif : "Porte d'entrée" dans le monde des candidats médicament. Les tests de criblage.

La figure 3 est une représentation schématique du monde des molécules organiques. Sa partie supérieure, en rouge, figure les molécules thermiquement instables et sans existence durable à la température ambiante. Le rectangle bleu représente les molécules stables à température ambiante. Parmi elles, on trouve un ensemble, en jaune, des molécules pharmacologiquement actives, et un ensemble, en vert, des molécules chimiquement ou biologiquement accessibles. L'intersection de ces deux derniers ensembles représente les candidats médicaments. Dans ce contexte, le pharmacochimiste a deux objectifs : augmenter la surface du rectangle vert d'une part, en mettant au point de nouvelles méthodes de synthèse, et d'autre part trouver les portes d'entrée au rectangle blanc, en parcourant le plus efficacement possible le rectangle vert.

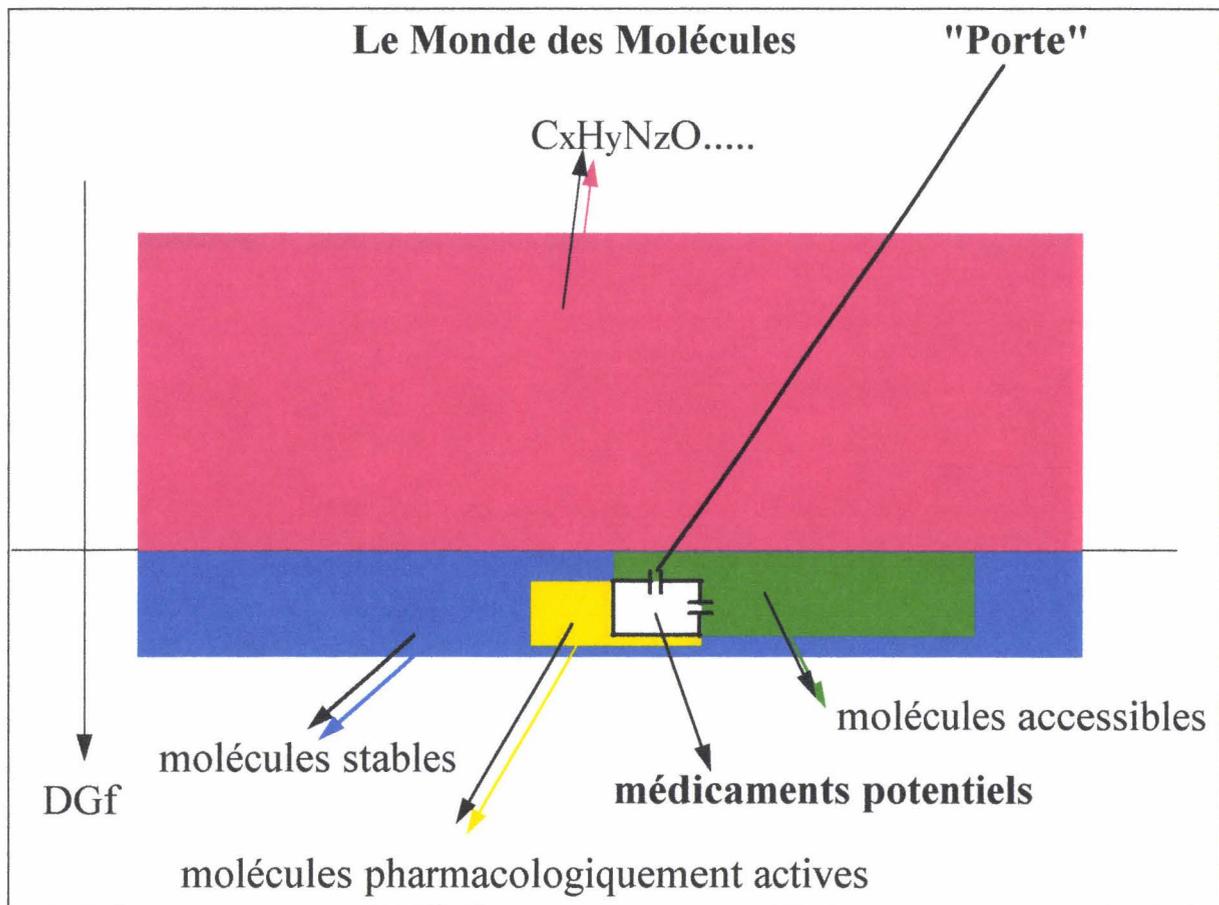


Figure 3. *Le monde des molécules.*

L'identification de structures biologiquement actives constitue l'objectif de la majorité des utilisations des stratégies combinatoires. Pour cette utilisation, une bibliothèque idéale serait de divergence maximale, de manière à éviter de tester à plusieurs reprises des analogues d'activités similaires. Il s'agit en effet d'exploiter de façon optimale les capacités de synthèse. C'est-à-dire de trouver quelques portes d'entrée dans le monde des molécules actives sans vouloir dans une première étape trouver le composé optimal. L'optimisation fera l'objet d'une seconde étape combinatoire ou non, par laquelle on s'efforcera de créer un ensemble dense de molécules autour du composé initial.

La notion de divergence est particulièrement cruciale si les composés sont évalués en mélange. En effet, les activités cumulatives de congénères trop similaires les uns aux autres risquent d'engendrer une activité globale importante à laquelle il ne sera pas possible d'attacher une structure intéressante. La notion de complexité est elle aussi très importante à ce niveau

puisque à noyer un composé actif dans un grand nombre de composés inactifs, on risque d'en interdire la détection. La bibliothèque totalement divergente est par définition une utopie. Mais une utopie dont il est difficile de se rapprocher par les techniques de synthèse en mélange, car ces méthodes imposent le plus souvent une homogénéité de réactivité entre les monomères utilisés, ainsi qu'une unicité dans le lien chimique qui va les unir. Le meilleur exemple en est celui des bibliothèques de peptides qui comportent souvent des milliers voire des millions de composants mais dont la diversité médiocre se traduit par une divergence faible et des effets cumulatifs considérables. Le mélange « post-synthèse » des composés préparés par synthèse parallèle est beaucoup plus adapté à la préparation de bibliothèque de large divergence. Chaque composé ayant été préparé séparément, on ne rencontre plus de contrainte au niveau de la diversité structurale des monomères, ni même du lien chimique. Une dernière possibilité pour s'affranchir des problèmes de complexité et de divergence, et qui est conditionnée par l'existence de systèmes de criblage de très haute capacité, consiste en l'évaluation séparée de composés synthétisés individuellement.

B - Recherche d'un *mélange* actif : l'exemple des Mixotopes.

Il s'agit d'une stratégie combinatoire que nous avons été les premiers à développer et qui sera développée dans la deuxième partie de ce travail.

Le but, dans ce cas, est diamétralement opposé au précédent. Il n'est plus question ici d'identifier un composé actif au sein d'un mélange mais de préparer un mélange ayant une activité biologique particulière, plus large que celle de chaque congénère pris individuellement. Ces bibliothèques seront convergentes, et idéalement chaque constituant du mélange doit participer à l'activité de la bibliothèque. Dans ce cas, la complexité (nombre de congénères présents dans le mélange), comme nous le démontrerons, joue un rôle beaucoup moins important que dans le cas précédent. A la notion d'entité active se substitue celle de

continuum d'activité. En corollaire, compte tenu de la nécessaire parenté structurale des constituants de ces mélanges que nous avons appelé Mixotopes, leur synthèse se réalise sans trop de difficultés au moyen des techniques de synthèse combinatoire en phase solide auxquelles nous avons apporté quelques améliorations ponctuelles et que nous avons automatisées.

II-BIBLIOTHEQUES DIVERGENTES. DECOUVERTE DE NOUVEAUX MEDICAMENTS.

Publication n°1 : «Bibliothèques combinatoires orthogonales»

Journal of the American Chemical Society, 1995, 117, p5405-5406.

En l'espace de quelques années, le criblage à haut débit (*High Throughput Screening HTS*) est devenu une étape incontournable du processus de découverte de nouveaux médicaments. Nous chercherons dans un premier temps à montrer comment la chimie combinatoire est une conséquence logique de cette évolution. Dans second temps, nous évoquerons une partie de nos travaux dans ce domaine, qui ont principalement concerné la mise au point d'une stratégie originale permettant l'identification directe d'une entité active au sein d'un mélange. En parallèle, nous proposerons une classification rationnelle des différentes méthodes d'identification basée sur une représentation matricielle des bibliothèques combinatoires. Enfin, nous illustrerons notre approche en décrivant la découverte d'un inhibiteur du récepteur V2 de la vasopressine au moyen de 2 bibliothèques orthogonales permettant d'évaluer l'activité biologique de 15625 composés en seulement 250 tests.

II-1-LA DECOUVERTE D'UNE TETE DE SERIE, PIERRE ANGULAIRE DE LA RECHERCHE PHARMACEUTIQUE

L'étape-clé dans la découverte d'un nouveau médicament est l'identification d'une entité moléculaire susceptible d'interférer avec un processus biologique normal ou pathologique. L'entité moléculaire doit être capable de se lier de manière efficace et spécifique à l'une des molécules naturelles qui interviennent dans de ce processus. La molécule naturelle, dite « cible » peut être par exemple le récepteur d'une hormone. La liaison d'un ligand à ce récepteur, peut soit l'activer, si le ligand est un agoniste, soit empêcher son activation par l'hormone, si le ligand est un antagoniste. La cible peut également être une enzyme dont on bloque l'activité en occupant le site catalytique. Dans tous les cas, un ajustement moléculaire parfait du ligand à sa cible est l'un des garants de l'efficacité et de la spécificité de son action pharmacologique.

A - LES STRATEGIES DE LA DECOUVERTE

La découverte d'une telle structure, protégée par des brevets solides constitue donc une étape capitale dans le processus qui aboutit plusieurs années plus tard à la mise sur le marché d'un médicament. Cette étape est longtemps resté un processus lent le plus souvent gouverné par le hasard et la chance (« serendipity »). Pour tenter d'accélérer cette étape, des stratégies très différentes ont été élaborées. On peut citer parmi elles :

A-1- Les « biotechnologies »

Ces technologies permettent de produire chez des organismes génétiquement modifiés, de grandes quantités de ligands naturels, des hormones par exemple. Ces produits offrent l'avantage de rester très proches des mécanismes physiologiques. Malheureusement, le plus souvent, les médicaments qui en sont issus, en plus d'être coûteux, ne sont utilisables, de part leur fragilité métabolique, que par voie parentérale.

A-2- La modélisation moléculaire et le drug design "*ab initio*" :

Ils devaient permettre, connaissant avec précision la structure tridimensionnelle d'un récepteur, d'en concevoir par le calcul un ligand idéal, en exploitant au mieux les interactions moléculaires potentielles. Si ces méthodes de modélisation sont devenues des outils précieux pour l'optimisation d'une tête de série existante, elles ne se sont pas montrées à la hauteur des espoirs qu'elles avaient suscités pour la conception *ab initio* . D'une part, les champs de force utilisés dans les différents algorithmes de modélisation se sont révélés insuffisamment réalistes tant au niveau de la construction des modèles que de la modélisation des interactions entre les ligands potentiels et les récepteurs. D'autre part, les structures chimiques ainsi définies ne sont pas à coup sûr chimiquement accessibles.

Enfin, ces deux stratégies ont en commun le fait que, les mêmes causes produisant les mêmes effets, elles conduisent à des solutions consensuelles dont le manque d'originalité ou la

caractère « prédictible » constituent un inconvénient significatif en termes de protection industrielle.

A-3- Le criblage systématique.

La stratégie actuellement privilégiée dans l'industrie pharmaceutique repose sur le criblage (screening) systématique de collections de produits chimiques différents, appelées pharmacothèques.

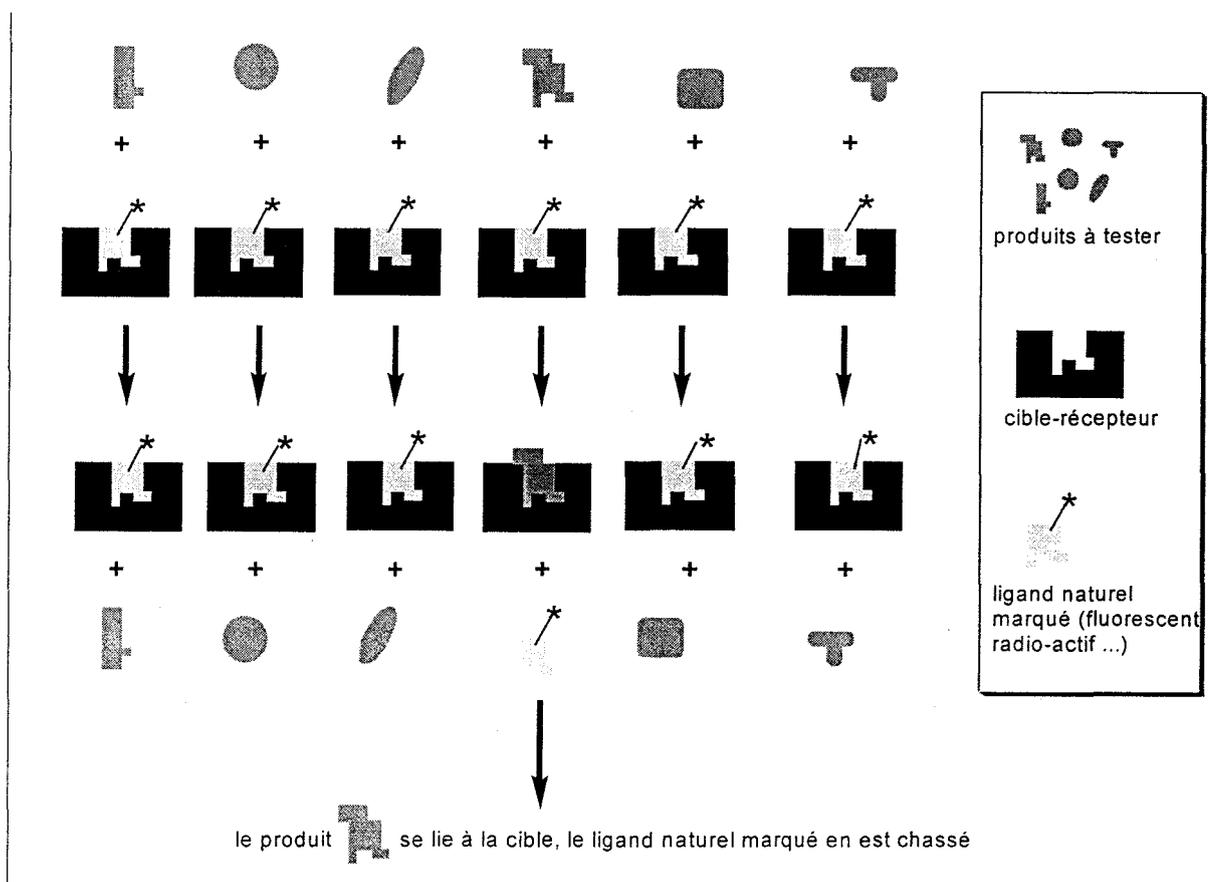


Figure 4. Principe du criblage systématique.

La démarche est « simple » : après avoir relié un phénomène physiopathologique à un couple ligand /récepteur, on met au point un test permettant de visualiser cette liaison. Dans le cas le plus simple, le récepteur est immobilisé sur un support solide et le ligand est modifié au moyen d'un marqueur qui le rend facilement identifiable. Si l'on ajoute à ce couple une entité

chimique susceptible de s'associer au récepteur en occupant la place du ligand, le déplacement du ligand marqué sera facilement détecté.

En général, le composé chimique ainsi identifié ne constitue pas le médicament final. En effet, il donne lieu à la synthèse de molécules de structures voisines qui permettront d'optimiser son activité. L'identification d'un tel composé, dit « tête de série » ou « lead », constitue donc une étape extrêmement importante.

Le contexte économique dans lequel évoluent les compagnies pharmaceutiques est extrêmement concurrentiel. Pour accéder au marché dans les meilleures conditions, ces compagnies se livrent une véritable guerre de vitesse : les délais de réalisation alloués aux projets diminuent. On demande aux responsables de la recherche d'amont d'accélérer leurs processus, et la chimie qui est devenue un des phénomènes limitants, se voit contrainte à une profonde évolution. Notamment à l'étape de découverte primaire, pour laquelle il est devenu crucial d'alimenter les tests de criblage le plus rapidement possible avec des collections de composés les plus divers et les plus nombreux. Cette orientation est la conséquence de deux observations : l'optimisation des têtes de série requise avant le passage en toxicologie et clinique est une étape extrêmement laborieuse, et dont l'issue n'est jamais garantie. Cette optimisation peut être modélisée sous la forme d'une marche chimique dans un espace multidimensionnel. Le chimiste synthétise des composés qui sont ensuite évalués dans un hyperespace dont les dimensions sont aussi variées que la biodisponibilité per os, les différentes caractéristiques pharmacocinétiques et dynamiques (telles que la sélectivité, la puissance ou encore la toxicité). La figure 5 montre une projection en deux dimensions de cet espace. Dans l'état actuel des connaissances, la marche dans cet espace se fait quasiment sans visibilité. Il n'existe pas de modèles multiparamètres prédictifs fiables dans les disciplines citées au dessus) et l'optimisation est bien souvent piégée dans un minimum local. Dans l'exemple de la figure 5, le lead bleu, qui semble a priori le meilleur des trois candidats a en

citées au dessus) et l'optimisation est bien souvent piégée dans un minimum local. Dans l'exemple de la figure 5, le lead bleu, qui semble a priori le meilleur des trois candidats a en fait très peu de chance d'évoluer vers une structure convenable, c'est-à-dire située au dessous de la barre rouge (niveau requis pour passer en développement). Tandis que le lead rouge, moins satisfaisant au départ sera par contre facilement optimisé puisque les structures voisines s'avéreront très rapidement meilleures, permettant d'aboutir au minimum absolu.

Dans ce contexte, un effort important est maintenant consenti pour « arroser », grâce au criblage systématique, cet espace d'une pluie de ligands, dont les optimisations se feront en parallèle, avec des chances d'aboutir rapidement à des structures développables.

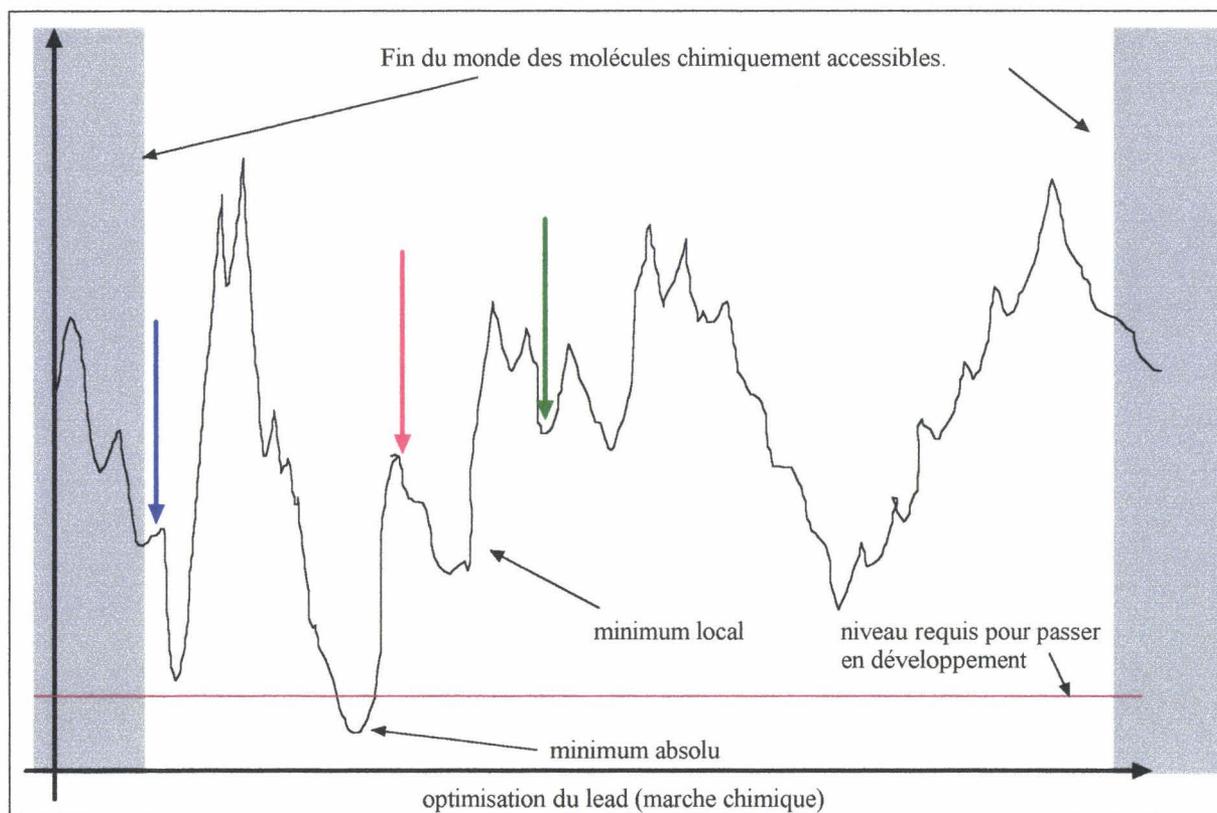


Figure 5 *Marche aveugle dans le monde des molécules, lancée du fond d'un naufrage.*

Un autre avantage considérable du criblage systématique est que les composés identifiés sont les fruits d'une démarche purement empirique. Leur « brevetabilité » s'en trouve renforcée dans la mesure où leur activité n'était pas prévisible.

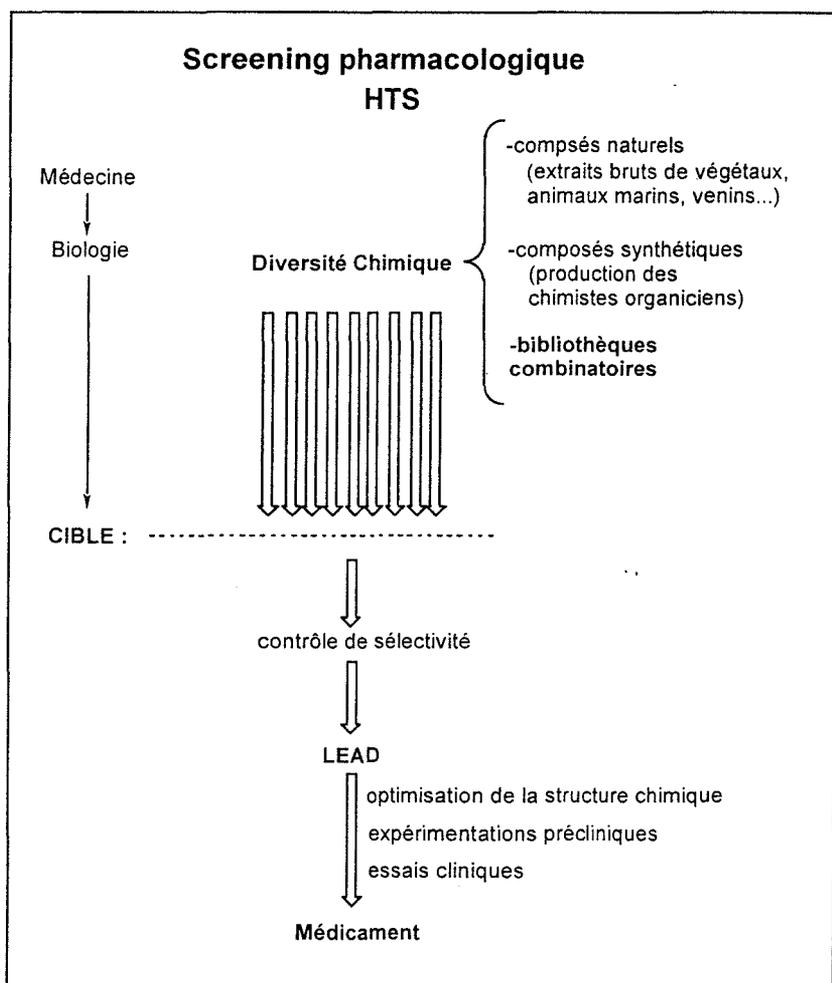


Figure 6. Schéma du processus de criblage systématique

B- LE CRIBLAGE SYSTEMATIQUE A HAUT DEBIT (HTS).

Etant donné les succès rencontrés avec cette approche, d'énormes efforts ont été consentis pour augmenter le nombre de molécules susceptibles d'être soumises aux tests de criblage. La première étape a consisté en une automatisation des procédés, faisant en particulier appel à des robots dérivés de ceux utilisés dans les laboratoires d'analyse médicale. Il est possible actuellement d'évaluer entre 100.000 et 1.000.000 composés chimiques différents par an dans un test de criblage donné. La plupart des compagnies pharmaceutiques disposent de dizaines, voire de plus d'une centaine de tests de criblage différents.

L'autre clé de succès dans cette stratégie est l'accès aux composés soumis au criblage. Ce facteur devient de plus en plus déterminant car si l'augmentation de la capacité de criblage

d'un facteur 10 relève d'une optimisation robotique, cette augmentation nécessite de se procurer 10 fois plus de composés différents, ce qui relève d'une démarche extensive beaucoup plus complexe. Jusqu'à ce qu'apparaissent les méthodes de chimie combinatoire, ces composés avaient deux sources principales.

B- 1- Les produits naturels.

Ils ont de mémoire humaine toujours représenté une source abondante et précieuse de structures biologiquement actives. Cette approche se heurte néanmoins à deux difficultés souvent sous-estimées : d'une part, quand une activité a été détectée, dans un extrait de plante par exemple, il est nécessaire de procéder à des opérations de purification et d'identification structurale souvent complexes, dont l'issue ne peut être garantie. Paradoxalement, un produit très actif est susceptible d'être détecté même s'il est très faiblement concentré. Ainsi, si sa détection est facile, son identification structurale risque d'être laborieuse (approvisionnement en matière première naturelle, concentration des fractions actives). D'autre part, la structure une fois connue, sa complexité peut en interdire toute tentative de synthèse économiquement viable, ce qui constitue un obstacle majeur, si l'approvisionnement à partir de la source naturelle est limité¹. Il faut également souligner que les pays les plus riches biologiquement (zones intertropicales), d'une part n'offrent pas toujours les meilleures garanties de stabilité politique et économique, et d'autre part, soucieux de protéger leur biodiversité, en limitent sévèrement l'accès.

B-2- Les collections historiques de produits synthétisés à l'occasion des différents programmes de recherche des sociétés pharmaceutiques.

De telles collections, outre d'être périssables (par consommation ou dégradation), présentent souvent l'inconvénient de ne permettre d'explorer qu'une faible partie de la diversité moléculaire puisqu'elles sont, de par leur origine, focalisées sur certaines séries chimiques.

B-3- Les méthodes de synthèse combinatoire :

Nous en avons exposé le principe général dans l'introduction. Par sa capacité à engendrer rapidement de nombreuses entités chimiques, la synthèse combinatoire s'est rapidement imposée en complément du criblage à haut débit. Il convient néanmoins de ne pas sous-estimer les autres avantages qu'elle offre.

D'une part les composés issus de la synthèse combinatoire dérivent de chimie humainement contrôlées, généralement robuste et de monomères facilement accessibles. La préparation d'analogues et la synthèse à grande échelle devraient s'en trouver simplifiées.

D'autre part, à la différence du cas des mélanges naturels, pour lesquels les étapes de purification et d'identification structurales sont incontournables, le chimiste combinatoire contrôle dès leur préparation le format de ses bibliothèques combinatoires. Il pourra donc organiser à volonté ce format de manière à faciliter l'identification structurale, comme nous nous attacherons à le démontrer dans le chapitre suivant.

C- DECODAGES ET DECONVOLUTIONS

C-1- Principes généraux :

Dans les stratégies de criblage systématique de composés naturels, la détection d'une activité est toujours suivie par des étapes longues et difficiles de purification et d'élucidation structurale. *A contrario*, quand le criblage fait appel à la chimie combinatoire, l'identification des composés actifs est grandement simplifiée : la chimie combinatoire permet en effet d'engendrer des mélanges de composés structurellement divers dans un format prédéterminé.

Ce format sera dès le départ conçu pour faciliter à la fois la détection et l'identification des entités actives.

Les méthodes d'identification se répartissent en deux catégories : les méthodes dites « d'étiquetage moléculaire » d'une part, et les méthodes de déconvolution d'autre part. Les premières sont directes alors que les secondes nécessitent plusieurs synthèses et plusieurs évaluations biologiques des mêmes structures moléculaires.

L'étiquetage moléculaire nécessite toujours le recours aux méthodes de synthèse en phase solide pour la préparation des bibliothèques, alors que les méthodes de déconvolution et les méthodes apparentées s'appliquent à des bibliothèques synthétisées aussi bien en phase homogène qu'en phase solide. Le choix dans ce cas n'appartenant qu'au chimiste, qui opte pour la méthode la plus appropriée à la réalisation de ses synthèses. Il faut mentionner que ce choix pourra représenter une contrainte majeure au niveau des tests biologiques, puisque certains d'entre eux ne permettent pas d'évaluer des molécules encore liées à un support insoluble (cas des tests utilisant des récepteurs ancrés dans des membranes)

C-2- étiquetage moléculaire ou « molecular tagging ».

C-2-1- principe du « one bead / one compound ».

Il s'agit d'une conséquence inattendue du principe de la synthèse en phase solide. En synthèse en phase solide, l'utilisation de grands excès de réactif est classique. En effet, ces excès, facilement éliminés en fin de réaction par simples lavages, permettent de travailler en grandes concentrations de réactifs, et d'améliorer la sélectivité des réactions, d'augmenter leur vitesse, et d'accroître la pureté des produits. En synthèse combinatoire, malheureusement, ce principe se heurte au risque de voir les réactifs aux cinétiques les favorables préférentiellement incorporés et surreprésentés ensuite dans le mélange final, au détriment des composés les moins réactifs. La solution à ce problème, appelée « DCR », illustrée dans la figure 7, est très simple.

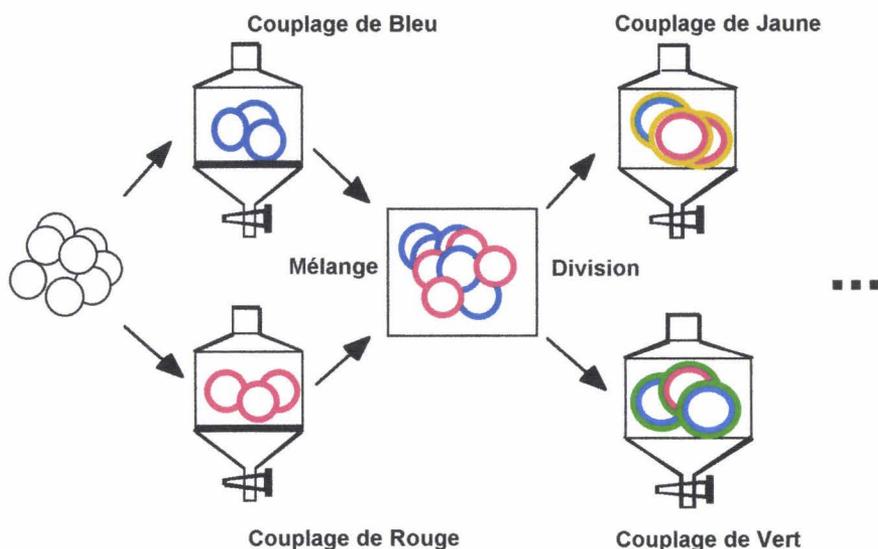


Figure 7. Illustration de la méthode DCR.

Préalablement à chaque étape de couplage combinatoire, le support polymérique insoluble est divisé en autant de lots qu'il y a de réactifs à introduire à cette étape de synthèse. Chacun des réactifs est alors mis en réaction individuellement dans un réacteur séparé. Ceci permet d'utiliser de gros excès sans craindre d'incorporation préférentielle. En fin de réaction, après l'élimination par simple lavage des excès de réactifs qui sont restés en solution, les résines contenues dans les différents réacteurs sont mélangées, et l'on peut procéder à l'étape suivante. Si cette stratégie n'a pas d'effet majeur sur la composition macroscopique du mélange final, elle a un profond retentissement sur sa composition microscopique. En effet les supports utilisés pour la synthèse en phase solide sont constitués de « billes » de polymère -le plus souvent de polystyrène - dont le diamètre va de 25 à 200 μm , et sur lesquels les composés sont fixés de manière covalente. Lors de l'étape de division de la résine, chaque bille sera dirigée vers l'un des réacteurs pour y recevoir un seul des réactifs à coupler. Ce mécanisme se répète à chaque étape de division et de couplage. Ainsi, en fin de synthèse, chaque bille aura suivi un chemin réactionnel particulier, et portera donc une seule espèce moléculaire². Au cours de ce processus, du fait de son indivisibilité, la bille de polymère constitue l'unité de synthèse. Cette observation a permis le développement de nombreuses

méthodes ingénieuses à la fois pour la mise en évidence et l'identification de composés biologiquement actifs.

La quantité de composé présente sur une bille standard, de l'ordre de d'une dizaine à quelques centaines de nanomoles peut être suffisante pour la mise en évidence d'une activité biologique et la caractérisation structurale de l'entité responsable de cette activité. Les premiers travaux effectués dans ce domaine concernaient des molécules de nature peptidique. Pour identifier la séquence peptidique reconnue par un anticorps monoclonal, les billes étaient étalées sous forme d'une monocouche et mise en présence de l'anticorps marqué. Les billes portant à leur surface un peptide reconnu par l'anticorps sont ainsi facilement repérées et isolées à l'aide d'un micromanipulateur sous l'objectif d'un microscope. La séquence du peptide peut alors être déterminée par une dégradation récurrente d'Edman³. Il suffit d'introduire la bille marquée par l'anticorps dans le réacteur d'un microséquenceur commercial. Cette méthode très élégante a connu de nombreuses améliorations en l'espace de quelques années. En effet, certains tests biologiques ne peuvent se pratiquer avec des molécules encore ancrées sur un polymère, et des stratégies faisant appel à des doubles ancrages au polymère de stabilités différentes ont été mises au point. Ces ancrages permettent de libérer une fraction du composé présent à la surface de chaque bille pour le tester, tout en laissant une deuxième fraction fixée, de manière à en permettre l'identification structurale.

C-2-2- l'étiquetage moléculaire.

On a reproché à la méthode « DCR » de ne s'appliquer qu'à des structures de nature peptidique, seules susceptibles d'être identifiées par dégradation récurrente d'Edman. Une telle limitation représente un inconvénient majeur en termes de diversité structurale. Récemment il a été montré⁴ que des spectres de RMN peuvent être réalisés sur une seule bille de polymère et permettent, dans des cas simples de molécules non peptidiques, l'identification de la molécule fixée sur cette bille. Mais la qualité des spectres obtenus⁵ laisse un doute sur la possibilité

d'élucider la structure d'un composé réellement inconnu à l'aide de cette seule technique. Néanmoins, pour élargir le champs d'application de cette stratégie à la synthèse et aux tests de molécules non directement identifiables par séquençage ou RMN, des méthodes d'étiquetage des billes de résine ont été développées⁶.

Le principe consiste à dissocier les fonctions de liaison au récepteur et d'identification de la structure de l'entité liante (« molécule-ligand ») Pour la première fonction on recherchera la diversité maximale, pour la deuxième fonction, on recherchera un système robuste sensible et universel.

Pour cela, utilisant la méthode « DCR », à chaque division du support de synthèse, on réalisera deux réactions de façons indépendantes, l'une pour la synthèse de la molécule-ligand, l'autre pour la synthèse des molécules ou de la molécule « codante ». L'analyse de la molécule codante permettra de déterminer la structure théorique de la molécule-ligand. Dans la pratique, la structure de la molécule codante permet de déterminer les étapes de synthèse qui ont été réalisées sur ce grain de résine, et qui doivent théoriquement conduire à la « structure ligand ».

Les premières stratégies d'étiquetage moléculaire ont utilisé les peptides comme molécules codantes. Dans ce cas, à chaque variant d'une position variable donnée correspond un acide aminé séquençable. Un séquençage selon Edman permet d'identifier le variant fixé sur ce grain de résine pour chaque position variable de la synthèse. La seconde génération d'étiquetage moléculaire repose sur un codage non séquentiel : l'historique complet de la synthèse de la molécule-ligand est enregistré sur chaque bille sous la forme d'un codage chimique binaire.

Selon ce principe, qui n'est pas sans rappeler celui du code-barre, n marqueurs chimiques différents permettent de coder pour 2^n événements de synthèse tels que la nature du variant et

sa position dans la synthèse. Quand une bille « ligand » a été mise en évidence, les marqueurs qu'elle porte sont clivés simultanément (le plus souvent par photolyse). On obtient un mélange de marqueurs, que l'on sépare et identifie par chromatographie gazeuse avec détection par capture d'électrons (GC-EC). L'avantage de cette méthode est d'être très résolutive (elle permet donc d'utiliser un grand nombre de marqueurs chimiques) et d'une sensibilité permettant la détection des marqueurs dans les quantités délivrables par la photolyse d'une seule bille. Cette sensibilité est telle qu'elle permet de limiter à moins de 1% la part de la charge chimique disponible sur une bille affectée à l'étiquetage.

Quoique très élégantes, les méthodes d'étiquetage moléculaire ne connaissent pas le développement qui leur était promis à leur naissance. En effet, elles sont, pour la plupart, limitées aux bibliothèques synthétisées et testées en phase solide. Ceci restreint leur « convivialité » en matière de criblage biologique, limitant leur utilisation aux tests mettant en œuvre des récepteurs soluble et marqués. Par ailleurs, les conditions de criblage sont loin d'être naturelles, et par là susceptibles de donner lieu à de nombreux faux positifs : les structures actives dans un test sur bille et en présence des étiquettes moléculaires s'avèrent souvent complètement inactives lors d'un test en solution (faux positifs). On estime généralement que c'est la coexistence de plusieurs molécules à proximité l'une de l'autre à la surface de la bille qui est responsable de l'activité. Celle-ci disparaît donc une fois les molécules libérées en solution. De même, il est certain qu'ancrées au polymère, les molécules-ligand n'offrent qu'une fraction de leurs interactions potentielles au récepteur. Ce masquage d'une partie de la surface moléculaire par le support polymérique peut être responsable de la non détection d'espèces actives (fausse négativité). Pour ces raisons ont été mises au point des méthodes de clivage des molécules-ligand respectant l'ancrage des étiquettes ou encore des méthodes de clivage partiel des molécules-ligand, permettant le criblage en solution.

Néanmoins il faut garder à l'esprit qu'en termes de rentabilité du processus de découverte de nouvelles substances pharmacologiquement actives, les faux négatifs sont beaucoup moins pénalisants que les faux positifs qui eux, entraînent une série d'actions fatalement stériles (lecture de l'étiquette, resynthèse de la molécule ligand, confirmation d'activité en solution).

Enfin et surtout, la réalisation chimique de telles bibliothèques pose de nombreuses difficultés. Elle nécessite la mise au point d'une chimie d'assemblage des molécules-ligand respectant la structure des étiquettes moléculaires. De même, le « collage » ou « l'écriture » des étiquettes doit respecter la structure des molécules ligand, au risque de voir des positifs non confirmés lors d'une resynthèse conventionnelle.

Ces contraintes ont beaucoup limité l'étendue des méthodes chimiques d'assemblage combinatoire utilisables avec l'étiquetage moléculaire, et par voie de conséquence, la diversité structurale accessible par ces voies.

C-3- déconvolutions

C-3-1- principes généraux : Les bibliothèques combinatoires sont des matrices à N dimensions.

Comme il a été noté par Pirrung⁷, toute bibliothèque combinatoire peut être considérée comme une matrice à N dimensions, dans laquelle chaque dimension a un nombre n d'éléments égal au nombre de variants présents à une position variable donnée. Dans ce modèle, N représente le nombre d'étapes combinatoires impliquées dans la préparation de la bibliothèque. Pour illustrer cette représentation, deux exemples sont donnés dans la figure 8. La première matrice (figure 8a) représente une bibliothèque résultant de deux étapes combinatoires (l'étape « A » correspondant à la dimension A et l'étape « B » correspondant à la dimension B) impliquant chacune quatre variants ($n_A = 4$ et $n_B = 4$). Cette bibliothèque contient $n_A \cdot n_B$ composés. Chacun de ces 16 composés est un des éléments de la matrice 4x4. La seconde matrice (figure 8b) représente une bibliothèque dont la synthèse met en œuvre trois étapes combinatoires

impliquant chacune 4 variants. Cette bibliothèque contient 64 ($n^N = 4^3 = 64$) composés à trois positions variables. Dans ce cas également, ces 64 composés constituent les éléments de la matrice de 4 x4 x4. Et bien que leur représentation graphique soit moins aisée si $N > 3$, toute bibliothèque combinatoire peut-être représentée par une matrice de dimension N, chaque élément de la matrice correspondant à un composant (« N-mérique ») de la bibliothèque.

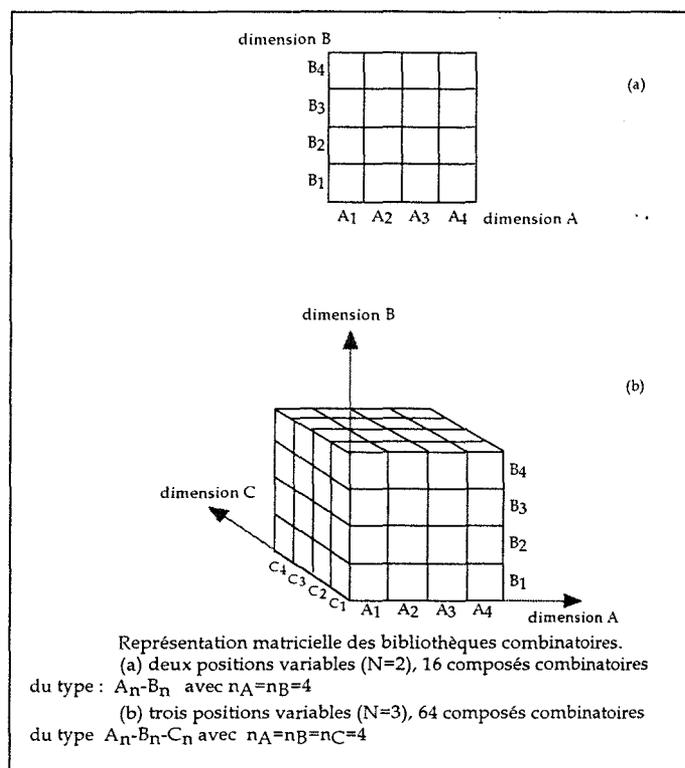


Figure 8. Représentations matricielles de deux bibliothèques.

Pour obtenir toute l'information qu'une bibliothèque peut receler, il faudrait pouvoir tester chaque composant de la bibliothèque et associer à la matrice de composés, une matrice homologue d'activités (biologiques dans notre cas). Ceci n'est réalisable que dans le cas des bibliothèques « spatialement adressées », obtenues par synthèses parallèles démarche qui, nous le verrons par la suite a retenu notre faveur⁸. Néanmoins, la plupart du temps le but du criblage rapide de bibliothèques combinatoires n'est pas, en général, une extraction exhaustive de toute l'information sur tous les composants de la bibliothèque. Et dès que la quantité d'information désirée diminue, le nombre d'expériences requis pour l'extraction de l'information se réduit. Par exemple, à la question suivante très simple (fermée) : « Existe-t-il

un composé actif sur mon test biologique dans cette bibliothèque? », on peut répondre en testant le mélange de tous les composants de la bibliothèque, pourvu que l'activité du produit actif soit détectable dans le bruit de fond susceptible d'être engendré par ses congénères . La question suivante (ouverte) sera « quelle est la structure du ou des composé(s) actif(s) de cette bibliothèque? ». Nous nous avons besoin d'information supplémentaire pour y répondre : il faudra procéder à de nouvelles expériences. Néanmoins, cette information est beaucoup restreinte que l'information totale théoriquement accessible à partir de cette bibliothèque (c'est-à-dire, la matrice complète d'activités reliée à la matrice de structures). Ainsi, le principe de la déconvolution est-il de limiter le nombre d'expériences biologiques nécessaires pour répondre à la question la plus importante « Quelle structure correspond à un produit actif », en entendant par actif, suffisamment actif, si ce n'est pas le plus actif dans la bibliothèque.

Différentes méthodes ont été proposées pour résoudre ce problème. Toutes sont basées sur une présentation redondante de la bibliothèque. La bibliothèque, dans tous les cas, est présentée sous la forme de x sous-bibliothèques qui se recouvrent plus ou moins entre elles. En fonction du recouvrement de ces sous-bibliothèques, on peut définir trois grandes méthodes de déconvolution. Ces trois méthodes sont : premièrement la déconvolution itérative, deuxièmement le balayage de position « positional scanning », et enfin troisièmement, la méthode des partitions orthogonales.

C-3-2- La déconvolution itérative.

Le principe de déconvolution itérative met en jeu la synthèse et le criblage de plusieurs séries de sous-bibliothèques. Il y a autant de séries qu'il y a de positions variables (N) ou de dimensions dans la matrice de la bibliothèque. Ces séries contiennent un nombre variable de sous-bibliothèques, égal au nombre de variants présents à chaque étape combinatoire de la synthèse (n). Au cours de la déconvolution, qui s'effectue de manière interactive avec les

biologistes, les sous-bibliothèques constituant les séries contiennent de moins en moins de produits, jusqu'à ce qu'un produit unique soit identifié. Le concept en est illustré dans la figure 9, par le cas d'une petite bibliothèque résultant de trois étapes combinatoires ($N = 3$) impliquant chacune un mélange de 4 variants ($n = 4$, et la bibliothèque contient $n^N = 4^3 = 64$ trimères).

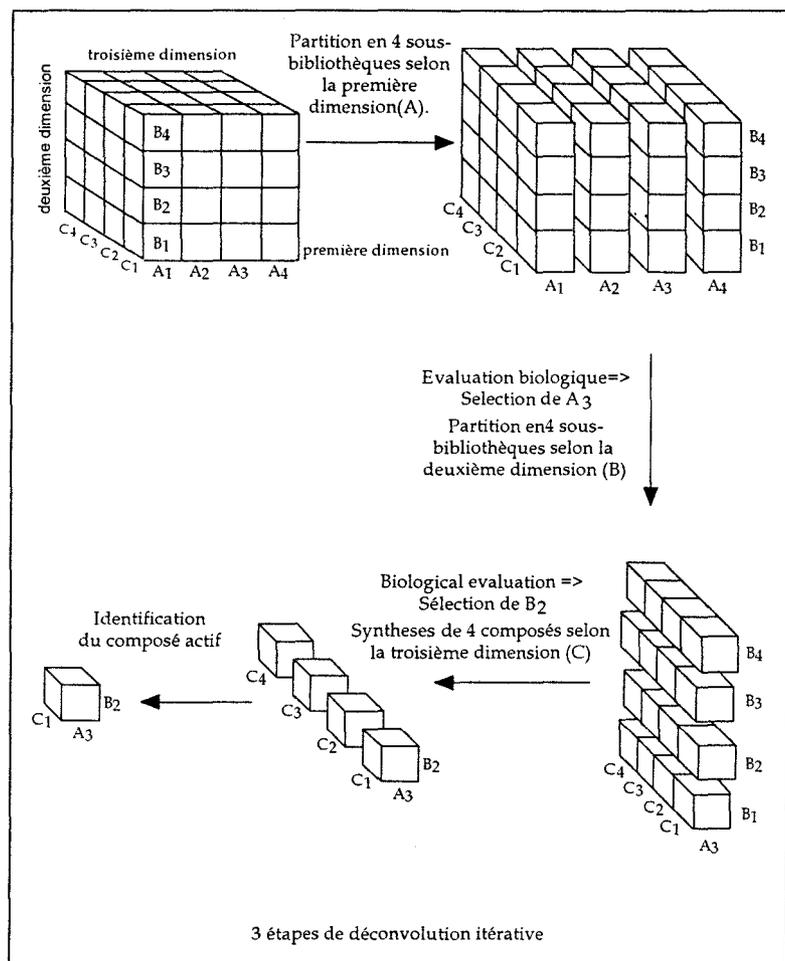


Figure 9. Schéma de déconvolution par déconvolution itérative.

Selon la convention proposée par Houghten⁹ pour la nomenclature des bibliothèques combinatoires, et dans laquelle X représente l'utilisation d'un mélange de variants à une étape de synthèse (4 dans ce cas), et O l'introduction d'un variant unique et défini, la bibliothèque totale est du type XXX. Si une activité biologique est détectée dans cette bibliothèque XXX, trois étapes de déconvolution itérative permettront d'identifier le composant responsable de l'activité ou d'une partie de l'activité de la bibliothèque XXX.

La première étape va permettre de définir le variant apportant une contribution au pharmacophore dans la position 1. Une première série de sous-bibliothèques de type OXX est donc préparée : à la première étape combinatoire de la synthèse, le chimiste incorpore un variant défini (« O »), tandis qu'aux deux étapes suivantes, il incorpore un mélange (« X ») de 4 variants. Chacune de ces 4 sous-bibliothèques (car $n = 4$), contient $1 \times 4 \times 4 (= 16)$ composants. Ces quatre sous bibliothèques constituent une partition de la bibliothèque XXX, puisque leur réunion constitue la bibliothèque XXX et que leurs intersections sont vides. Cette première partition de la bibliothèque est ensuite testée, pour déterminer quel variant de la position 1 contribue à l'édification du pharmacophore. Supposons que la sous-bibliothèque sélectionnée contient le variant A_3 en cette position.

Pour la deuxième étape de la déconvolution, le chimiste va préparer une deuxième série de sous-bibliothèques qui constituera une partition de la sous-bibliothèque A_3XX . Pour chacune des 4 sous-bibliothèques constituant cette série, à la première étape combinatoire de la synthèse, le chimiste incorpore A_3 seul, à la deuxième étape, il incorpore chacun des 4 variants isolément, puis le mélange des 4 variants pour la troisième étape. Il obtient 4 sous-bibliothèques de type A_3OX . Chacune de ces 4 sous-bibliothèques contient $1 \times 1 \times 4 = 4$ composants. La sélection de la sous-bibliothèque la plus active indiquera quel variant contribue au pharmacophore en position 2.

Si l'on suppose que la sous-bibliothèque la plus active de cette série contient le variant B_2 en position 2, alors pour la troisième et dernière étape de déconvolution ($N=3$), quatre nouvelles « sous-bibliothèques » constituant une ultime série-partition de A_3B_2X va être préparée. Chacune de ces 4 « sous-bibliothèques » contient $1 \times 1 \times 1 = 1$ composé.

Chacun de ces 4 composés est donc testé séparément, et à ce stade, on peut définir le dernier variant utile à la construction de la molécule active. Ces trois étapes de déconvolution itérative sont représenté sous forme de matrice dans la figure 9. Notons qu'au cours de la

déconvolution, la complexité des sous-bibliothèques diminue et que l'on converge vers une structure active. Cette déconvolution aura donc nécessité $N \times n = 3 \times 4 = 12$ synthèses pour identifier un composé actif parmi 64 ($n^N = 4^3 = 64$). Néanmoins la rentabilité r de la méthode - définie par le rapport du nombre de composés évalués au nombre de « synthèses » réalisées - s'accroît rapidement quand n et surtout N croissent. En effet r est défini par l'équation

$$\text{suivante : } r = \frac{n^N}{n \cdot N} = \frac{n^{N-1}}{N} .$$

Ainsi, une bibliothèque d'hexapeptides, construite à partir de 20 aminoacides contient 20^6 soit 64,000,000 peptides alors que sa déconvolution réclame la synthèse et l'évaluation de $20 \times 6 = 120$ sous-bibliothèques. La principale limitation, dans ce cas est bien sûr la capacité à détecter une espèce active au sein d'un mélange contenant un si grand nombre de composés ($20^5 = 3,200,000$), surtout si la bibliothèque est fortement divergente.

Néanmoins, en général, de telles bibliothèques sont de divergence limitée et si un composé actif y existe, il est pratiquement toujours entouré de congénères « sub-actifs », appelés par Freier des ligands sub-optimaux.

Cibles	Composition	Complexité	activité	activité du congénère sélectionné	SBF
<i>tests cellulaires :</i>					
HIV ¹⁰	PS ADN	4096	20µM	0,3µM	61
HSV ¹¹	PS ADN	16384	70µM	0,4µM	94
St. aureus ¹²	peptide	104976	450 µg/mL	3,4µg/mL	793
St. aureus ¹³	peptide	175616	44 µg/mL	2µg/mL	7983
<i>Liaison à des protéines :</i>					
HIV protease ¹⁴	peptide	11132	4400µM	1,4 µM	3,5
récepteurs opiacé ¹⁵	peptide	130321	452µM	0,028 µM	1057
récepteur de l'endothéline ¹⁶	peptide	992	35µM	2,5 nM	0,07
récepteur de l'endothéline ¹⁷	peptide	361	150 nM	5 nM	12
récepteur V2 de la vasopressine	tripeptide	125	7,5 mg/mL	25 ng/mL	0,5
récepteur de la dopamine ¹⁸	peptides	484	416 µM	1 µM	0,32
acétyl-cholinestérase ¹⁹	carbammates	6	3,7mM	668 µM	1,1

Table 1. Indice de Freier (SBF) pour quelques bibliothèques

Leurs effets cumulatifs engendrent une activité biologique détectable. Et dans ce cas les ligands sub-optimaux, s'ils facilitent la détection d'une activité à l'étape initiale de criblage biologique, risquent d'affecter notre capacité à sélectionner le ligand optimal, en détournant le processus de convergence.

Ceci a été clairement démontré en suivant l'évolution des activités biologiques des séries de sous-bibliothèques à chaque étape de déconvolution. A chaque étape de déconvolution, une nouvelle position est définie et la concentration en une espèce donnée subsistant à l'étape suivante est multipliée par n si n est le nombre de variants de l'étape déconvoluée. Dans la plupart des cas rapportés jusqu'ici, les activités biologiques n'ont pas cru de ce facteur n à chaque étape de déconvolution, comme il était attendu si un seul composé avait été actif. Ecker et ses collaborateurs²⁰ ont analysé l'évolution des activités lors de la déconvolution de bibliothèques oligomériques dans plusieurs cas publiés dans la littérature (table 1). En utilisant ces données, ils ont définis un Facteur de Liaison Sub-optimale (Sub-optimal Binding Factor) ou SBF, comme le rapport de l'activité observée sur l'activité présumée. Cette activité présumée est calculée en fonction de la simplification des sous-bibliothèques à chaque étape de déconvolution et selon l'hypothèse qu'il n'y a qu'un composé actif dans la sous-bibliothèque initiale. Une valeur élevée du SBF indique une forte contribution de ligands sub-optimaux à l'activité. A l'opposé, une valeur de 1 indique que les composés sélectionnés sont les seuls composés actifs dans la bibliothèque. La présence d'une grande quantité de ligands sub-optimaux est d'autant plus importante qu'à chaque étape de déconvolution, un choix irréversible est fait. L'approche la plus simple des stratégies de déconvolution consiste à postuler lors du choix de la sous-bibliothèque à déconvoluer, que la sous-bibliothèque la plus active contient le composé le plus actif. Un risque non négligeable est que le variant choisi n'est pas celui qui compose le produit le plus actif, mais au contraire celui qui se retrouve dans la majorité des ligands sub-optimaux, alors la déconvolution conduit à l'identification,

non du ligand optimal, mais d'un ligand sub-optimal. Pour éviter cet écueil, il faut, à chaque étape de déconvolution, examiner quels variants sont trouvés dans les 2 ou 3 sous-bibliothèques les plus actives. Si deux de ces variants sont structuralement très différents (à l'appréciation de l'expérimentateur), il est probable qu'il faudra explorer deux voies de déconvolutions initiées par ces deux variants et conduisant à deux ligands. Soit ces deux ligands présentent le même pharmacophore en utilisant les variants de façons différentes, soit ils présentent au contraire deux pharmacophores différents, s'il existe plusieurs façons pour une molécule de se lier au récepteur en question (exemple 1 en annexe).

Cette méthode de déconvolution s'est révélée efficace dans plusieurs cas, notamment lors de la recherche de ligands à deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires (« 7TM ») : le récepteur α -adrénergique et le récepteur μ aux opiacés.

Un inconvénient majeur de cette méthode est la nécessité de préparer et d'évaluer une nouvelle série de sous-bibliothèques à chaque étape de déconvolution. Même si la bibliothèque doit être utilisée dans de nombreux tests, il est improbable que les mêmes sous-bibliothèques soient impliquées. De nouvelles synthèses sont donc requises pour chaque activité détectée.

Ainsi Houghten prépare et évalue directement toutes les sous-bibliothèques de type OOX.....X. Dans le cas des bibliothèques utilisant les aminoacides naturels, il y a $n^2 = 400$ sous bibliothèques préparées à l'avance. Ces sous-bibliothèques sont préparées en évitant aux deux étapes combinatoires correspondantes (notées « OO »), de remélanger les résines après la division et les couplages des 20 variants. Les deux avantages de cette méthode sont, premièrement de diminuer la complexité des mélanges à tester initialement d'un facteur 400, et deuxièmement de limiter à 4 au lieu de 6 les étapes de déconvolution.

Une autre possibilité proposée par Erb²¹ pour accélérer le processus de déconvolution est de retirer et d'archiver une partie de chaque résine issue du couplage des différents variants aux

différentes étapes combinatoires avant remélange. Ces bibliothèques partielles - les molécules qui les constituent sont incomplètement synthétisées - sont utilisées à chaque étape de déconvolution.

C-3-3- « Balayage » des positions. («Positional scanning»).

Cette méthode a été conçue et mise en œuvre par Houghten pour l'évaluation de bibliothèques de peptides et a fait l'objet de revues^{22 et 23}. Cette méthode requiert de préparer N séries de n sous-bibliothèques. Chacune de ces séries réalise une partition de la bibliothèque complète, tout comme dans la première étape de déconvolution itérative. Et chacune de ces N séries de sous-bibliothèques sert à déterminer le variant utile dans chaque position variable de la molécule-ligand. Les sous-bibliothèques d'une série sont préparées en randomisant toutes les étapes de la synthèse sauf une où chaque variant est incorporé séparément.

Ainsi, pour chacune des N positions i combinatoires (« randomisées »), une série-partition de n_i sous-bibliothèques est préparée, avec n_i nombre de variants employés à l'étape i. La détermination de l'activité des sous-bibliothèques de ces séries permet d'identifier la structure des variants les plus adaptés à chaque position. A la différence de la méthode précédente, cette méthode ne requiert aucune interaction entre le chimiste et le biologiste pendant la déconvolution. Néanmoins, il faut noter que, contrairement au cas précédent, le processus de déconvolution n'est pas convergent, et que les produits sont toujours testés à haute dilution, ce qui peut poser des problèmes de détection. Un autre inconvénient est que cette méthode suppose la connectivité entre les variants conférant l'activité maximale en chacune des positions, ce qui n'est pas toujours le cas.

Si l'on emploie la nomenclature proposée par Houghten, une bibliothèque d'hexapeptides synthétisés à partir de 20 aminoacides (variants) sera formatée en 6 séries-partitions de chacune 20 sous-bibliothèques. Et il faudra tester les 120 sous-bibliothèques suivantes :

1^{ère} série : 20 sous-bibliothèque de type : OXXXXX

2^{ème} série : 20 sous-bibliothèque de type : XOXXXX

3^{ème} série : 20 sous-bibliothèque de type : XXOXXX

4^{ème} série : 20 sous-bibliothèque de type : XXXOXX

5^{ème} série : 20 sous-bibliothèque de type : XXXXOX

6^{ème} série : 20 sous-bibliothèque de type : XXXXXO.

Le scanning de position peut représenté à l'aide d'éléments matriciels, comme il est montré dans la figure 10.

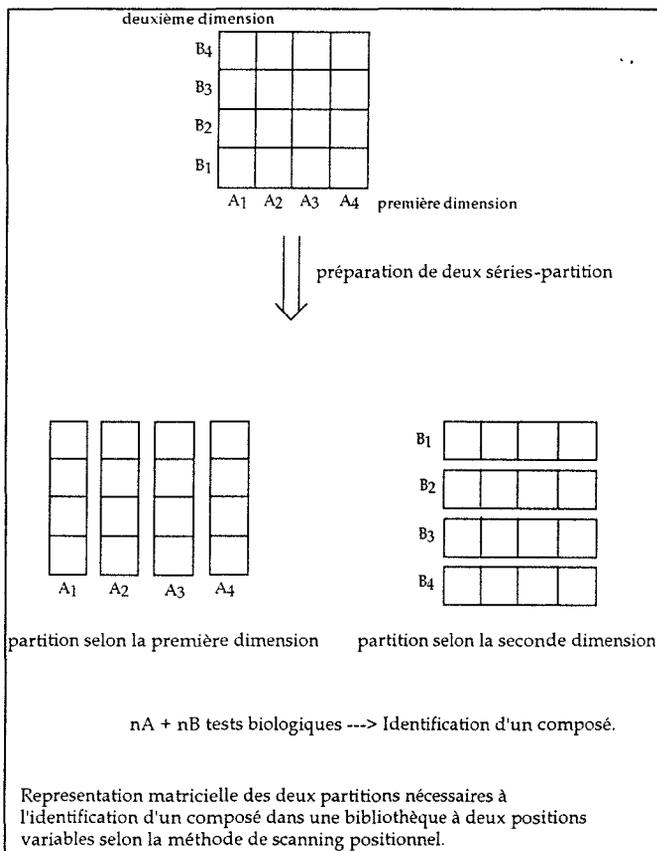


Figure 10. Schéma du « balayages des positions » .

Dans le cas simple d'un bibliothèque à deux positions variables A et B, préparée avec deux groupes de 4 variants, le groupe utilisé pour la position A et le groupe utilisé pour la position B ($n_A = n_B$, $N = 2$). Cette bibliothèque peut être représenté par une matrice bidimensionnelle 4 x 4, dont chacun des éléments correspond à un composant de la bibliothèque. Le scanning de position correspond à l'évaluation de 2 ($N = 2$) partitions de cette bibliothèque : la première suivant les colonnes, la seconde suivant les rangées.

Ainsi, une première série sera réalisée dans laquelle chaque variant de la position A (A_1 à A_4) sera couplé au mélange de variants de la position B. Parallèlement, la deuxième série sera réalisée en confrontant le mélange des variants de A à chaque variant de B (B_1 à B_4) pris séparément. Cette méthode a été utilisée par Houghten avec des bibliothèques de peptides obtenus par synthèse en phase solide mais aussi par Pirrung avec une bibliothèque de 54 carbamates préparés en solution²⁴. Cette dernière expérience constitue l'exemple 3 de l'annexe. Cette représentation peut bien entendu être étendue à des dimensionalités supérieures. La figure 11 montre le cas d'une bibliothèque correspondant à 3 ($N = 3$) étapes combinatoires, utilisant chacune 4 variants ($N_A = N_B = N_C = 4$).

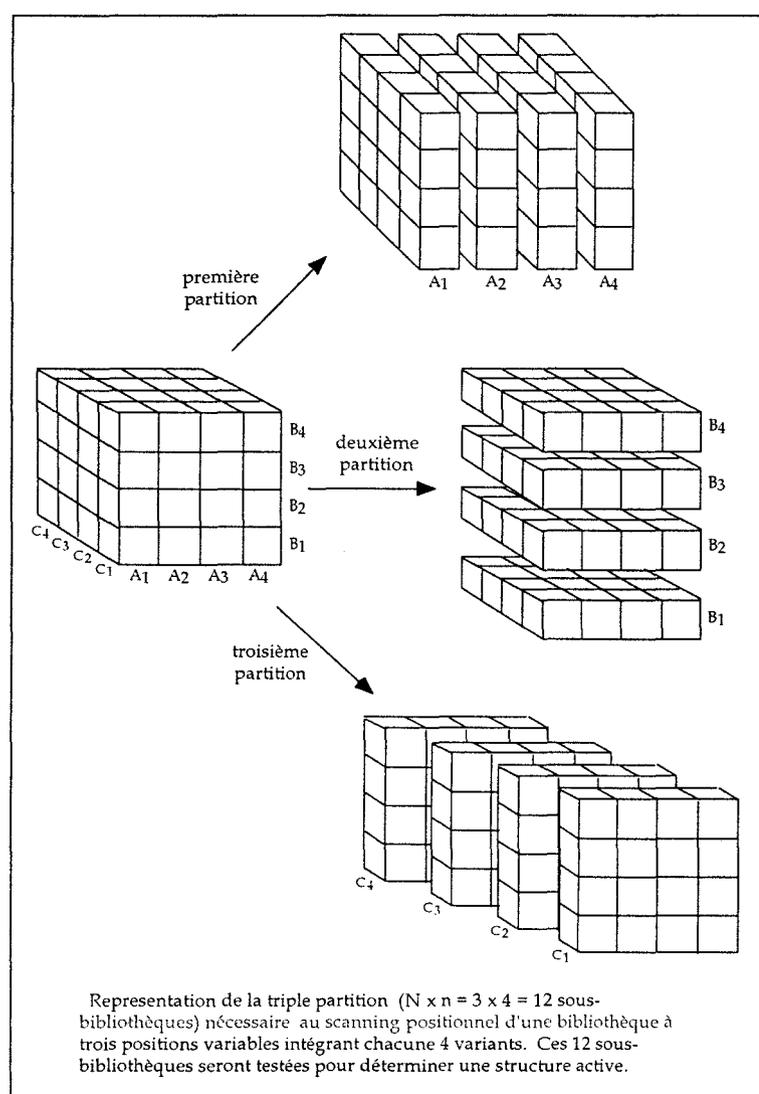


Figure 11. Version à trois positions variables du balayage.

Comparé à la déconvolution itérative, le scanning de position offre le principal avantage suivant : les différentes positions variables de la bibliothèque sont évaluées simultanément. Et les résultats obtenus permettent la définition immédiate d'un composé probablement actif. Le principal défaut est que ce produit aura été testé à une concentration égale à $C/n^{(N-1)}$ d'autant plus faible que le nombre d'étapes combinatoire N est important. Cette faible concentration nuit à la lisibilité des résultats biologiques du scanning positionnel (or si l'on considère le temps requis pour exécuter une déconvolution, le scanning positionnel prend un avantage contradictoire sur la déconvolution itérative quand N augmente). De plus, si plusieurs sous-bibliothèques s'avèrent actives dans chaque série, le nombre de produits à synthétiser comme candidats à l'activité croît exponentiellement. Imaginons que trois sous-bibliothèques soient trouvées actives dans chacune des 6 séries d'une bibliothèque d'hexapeptides, il faudra alors synthétiser $3^6 = 729$ tripeptides, même si parmi ces 729 hexapeptides seuls 3 sont actifs, car le scanning positionnel ne donne aucune information sur la connectivité entre les variants définis par les sous-bibliothèques actives. Parmi les propositions faites par Houghten²⁵, on peut citer la possibilité de préparer une sous-bibliothèque combinatoire correspondant seulement aux variants sélectionnés par le scanning positionnel pour enrichir les mélanges testés en produits actifs.

Mais on peut également décider de procéder à une déconvolution itérative complète en partant de la position variable la mieux définie par le scanning positionnel (position correspondant à une série pour laquelle les résultats biologiques sont contrastés et où le choix d'un variant s'impose). Dans ces deux cas, la définition d'un ligand (qui reste à confirmer) nécessite plusieurs « resynthèses » après le scanning.

C-4- Stratégies de synthèse et de préparation des bibliothèques.

La plupart des tests de criblage biologique ne sont réalisables qu'avec des produits candidats en solution (extraits naturels ou solutions des produits provenant des pharmacothèques). Soit

parcequ'ils utilisent des récepteurs insolubles (cellules, tissus), soit parce qu'ils ont été développés dans le but d'utiliser des produits en solution. Dans ce dernier cas la raison en est que les produits étant destinés à être utilisés *in fine* sous forme soluble, il est plus réaliste de faire les tests de criblage initiaux en solution.

Or les techniques de chimie en phase solide offrent des avantages indéniables en ce qui concerne à la fois les problèmes synthétiques (facilité de purification, possibilité d'utiliser de larges excès de réactifs) et les problèmes spécifiques de la synthèse combinatoires (manipulation de mélanges aisée, robotisation possible, méthode «DCR»). Une des plus grandes difficultés posées par la synthèse en phase solide sera donc de trouver un lien au polymère suffisamment stable pendant la synthèse, mais néanmoins clivable dans des conditions qui respectent la structure désirée (qui la respectent ou qui l'engendrent).

II-2- LES BIBLIOTHEQUES ORTHOGONALES : UNE NOUVELLE METHODE D'IDENTIFICATION DES COMPOSES ACTIFS AU SEIN DE MELANGES COMBINATOIRES.

Les méthodes présentées précédemment s'appliquent parfaitement au cas des bibliothèques obtenues par une synthèse multi-étape, comme la synthèse peptidique en particulier. Si elles ont toutes deux montré leur efficacité, la déconvolution itérative présente l'inconvénient majeur de nécessiter autant d'étapes de resynthèse que de positions variables pour chaque nouvelle activité détectée. Quant au scanning positionnel, il ne rencontre de réel succès que dans les cas de bibliothèques peu divergentes car il met en jeu des mélanges très complexes (problème de dilution des entités actives).

Aucune de ces stratégies ne s'applique au cas des mélanges réalisés après la synthèse, qu'il s'agisse de bibliothèques issues de la synthèse parallèle ou tout simplement d'une échantillothèque historique. Ces mélanges post-synthétiques sont parfois envisagés pour augmenter les cadences de criblage.

Nous avons mis au point une nouvelle méthode permettant d'identifier un composé actif au sein d'un mélange. Basé sur le mélange judicieux des constituants de la bibliothèque, comme le scanning positionnel, mais contrairement à la déconvolution itérative, cette stratégie dite des « bibliothèques orthogonales » permet une identification directe et sans resynthèse d'un composé actif au sein d'une bibliothèque combinatoire. Elle est de plus utilisable avec des mélanges non synthétiques (mélange de produits historiques)

A - ANALYSE CRITIQUE DES METHODES EXISTANTES. DEFINITION D'UNE STRATEGIE ALTERNATIVE.

A l'origine de la mise au point de notre méthode de déconvolution, nous avons un triple objectif : premièrement disposer d'une méthode générale, deuxièmement minimiser les

risques de faux positifs, troisièmement rendre les étapes de déconvolutions aussi simples que possible.

A-1- Une méthode générale.

Il fallait idéalement que cette méthode soit applicable à n'importe quelle série chimique, et quelle que soit la méthode de synthèse employée (phase solide ou phase homogène).

A-2- Réduire le nombre de faux positifs.

Il s'est rapidement avéré que l'un des défauts majeurs des méthodes qui consistent à tester des mélanges de produits, est d'engendrer un nombre considérable de faux positifs. Le problème de ces positifs est qu'on n'en peut déclarer la fausseté qu'après une série d'expériences généralement longue et coûteuse. Ces expériences mobilisent non seulement les équipes de biologie mais aussi celles de chimie (de synthèse, dans le cas des déconvolutions itératives ou du scanning de position, ou analytique dans le cas de l'étiquetage). Ces activités, auxquelles il est difficile sinon impossible, d'attribuer une structure chimique ont deux origines principales.

A-2-1- Les faux positifs dus à l'insuffisance de diversité structurale.

La synthèse combinatoire engendre de façon systématique, simultanément et au même endroit, un grand nombre de composés différents (i.e. non identiques) au départ d'un nombre restreint de matières premières (appelées variants, par exemples les 20 aminoacides naturels) en les combinant de différentes manières. Ces variants n'apportent donc qu'un nombre restreint d'éléments de pharmacophore. Ainsi, étant donnée une chimie d'assemblage, la diversité recelée par un mélange combinatoire sera corrélée à la diversité des variants ou plus exactement au rapport du nombre de variants mis en jeu pour réaliser ce mélange au nombre de produits obtenus dans ce mélange. On constate que ce rapport devient rapidement défavorable dans le cas des bibliothèques oligomériques pour lesquelles, au départ d'une vingtaine de variants, par la succession de nombreuses étapes de couplage, on fabrique des

millions de produits. Cette redondance structurale ne serait pas un problème si chacun des produits était testé séparément. Mais elle le devient dès que ces produits peu divers sont retrouvés ensemble dans un mélange et testés ensemble. En effet le « discernement » du récepteur varie d'un récepteur à l'autre, mais n'est jamais parfait. Ainsi pourra-t-il voir dans une famille de congénères structurellement proches et capables d'offrir un même pharmacophore, un seul et même type de molécule, à une concentration égale à la somme des concentrations de ces congénères. Si cette concentration « ressentie » par le récepteur est suffisante, un signal apparaît pendant le criblage biologique. Et la déconvolution qui s'en suit ne permet pas de définir une structure active, mais au mieux un congénère d'activité décevante.

Pour éviter cet écueil, dès la conception de notre bibliothèque nous sommes efforcés de constituer des mélanges combinatoires les plus divers possibles.

A-2-2- Les faux positifs liés aux réactions secondaires.

On peut diviser les réactions secondaires en deux catégories. D'une part, les réactions qui intéressent un variant particulier traité dans les conditions de synthèse, et d'autre part, les réactions secondaires qui n'ont lieu que lorsque deux variants sont présents simultanément. Le premier type de réaction secondaire est le moins gênant, car le produit secondaire sera un « satellite » permanent du produit attendu qui l'accompagne jusqu'à l'étape ultime de déconvolution. Lors de la confirmation d'activité, il s'avère que le produit purifié est peu actif ou inactif. Il « suffit » alors de reprendre le milieu réactionnel non purifié, de le chromatographier, et d'évaluer l'activité de toutes les fractions. La fraction active est ensuite soumise à une élucidation structurale classique qui sera facilitée par la connaissance des réactions qui l'ont engendré. Gardons néanmoins à l'esprit que paradoxalement, plus le produit est actif, plus son seuil de détection est bas, et que dans ce cas il est possible que des

traces de sous-produit soient biologiquement détectables mais que sa faible concentration en rende l'élucidation structurale très difficile, voire impossible.

Le deuxième type de réactions secondaires peut être beaucoup plus gênant. En effet, tous les types de déconvolution sont basés sur des partitions de la bibliothèque initiale qui impliquent une séparation des variants. Si la réaction implique la présence simultanée de deux variants dans la même position variable au cours de la synthèse combinatoire initiale, elle ne se produit plus lorsque ces deux variants sont dans des groupes différents. Alors le sous-produit n'est plus formé et paradoxalement l'activité disparaît dès que l'on essaie d'identifier le variant qui confère l'activité en cette position. Si c'est la présence d'un variant donné à une position (mais qui n'est pas le variant « pharmacophorique » en cette position) qui provoque la réaction secondaire sur un variant à une autre position, alors la déconvolution sera également stérile. Pour identifier ce type de situations, il faudrait procéder à des déconvolutions négatives. Pour chaque position variable, il faut constituer une série de sous-bibliothèques correspondant aux délétions successives des n variants de cette position. Chaque sous-bibliothèque contient $(n-1) n^{(n-1)}$ molécules. Ce type de déconvolution a été entrepris par Furka²⁶ et ses collaborateurs sans grand succès. Dans le cas décrit précédemment, il apparaîtrait que deux sous-bibliothèques correspondant à une position variable sont inactives : celle correspondant au variant « pharmacophorique », et celle correspondant au variant engendrant la réaction secondaire.

Ainsi pour éviter ce deuxième écueil, nous adoptons une position « défensive » utilisant des chimies d'assemblage robustes et des stratégies de protection adaptées à l'ensemble des variants utilisés est fortement conseillée.

A-3- Simplifier la procédure de déconvolution.

La lourdeur inhérente à l'utilisation de la déconvolution itérative provient du dialogue que doivent entretenir biologistes et chimistes. Chaque étape de déconvolution compte nécessairement une étape de sélection et de décision bipartite qui nécessite la coordination d'équipes parfois distantes. D'autre part, dans le contexte pharmaceutique en particulier, les bibliothèques à déconvolution itérative posent un problème de confidentialité : le chimiste qui procède à la déconvolution connaît nécessairement la structure de la molécule active. Par contre ces problèmes ne se rencontrent pas dans le cas des bibliothèques à scanning de position. En effet, une seule lecture de la bibliothèque permet de déterminer la structure d'un produit potentiellement actif. Il ne reste plus ensuite qu'à synthétiser cette molécule, ce qui ne relève plus de la chimie combinatoire et peut être réalisé dans n'importe quel laboratoire de chimie.

Dans ce sens, le scanning positionnel possède un avantage sur la déconvolution itérative.

Nous allons voir comment nous avons pu allier les avantages des deux méthodes et en éviter les inconvénients en utilisant le principe des bibliothèques dites « orthogonales ». Nous verrons aussi que cette méthode est très générale et qu'elle peut s'appliquer à des mélanges non combinatoires.

B- PRINCIPE DES BIBLIOTHEQUES ORTHOGONALES

Le principe général des bibliothèques orthogonales implique la préparation de 2 séries-partitions de la bibliothèque totale, quels que soient N et n_i . Ces deux séries contiennent chacune tous les congénères de la bibliothèque envisagée. Les sous-bibliothèques de ces deux séries sont telles que le nombre de composés par sous-bibliothèque est égal ou inférieur au nombre de sous-bibliothèques dans une série.

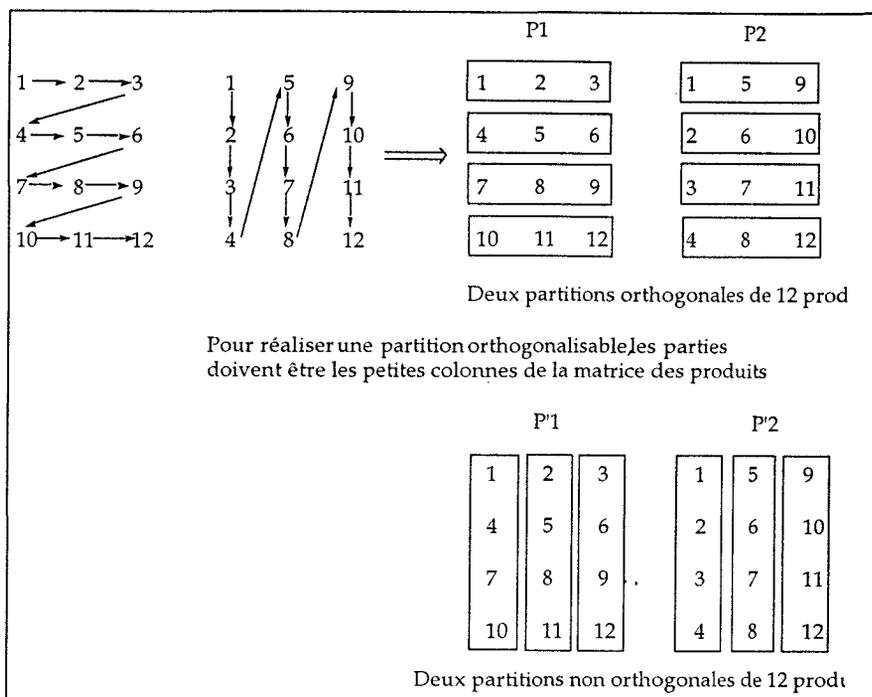


Figure 12. Principe des répartitions orthogonales d'une bibliothèque comportant 12 composants.

Ceci est illustré dans la figure 12, dans un cas où une bibliothèque contenant 12 composés est partitionnée en 4 sous-bibliothèques de 3 composés chacune ($3 < 4$). Nous dirons que les deux partitions P1 et P2 sont « orthogonales » car deux composés d'une même sous-bibliothèque de P1 se trouvent dans deux sous-bibliothèques de P2 et réciproquement. Par contre, les deux partitions P'1 et P'2 ne sont pas orthogonales : chaque sous-bibliothèque de P'1 a deux composés en commun avec chaque bibliothèque de P'2.

Dans le cas de la figure 12, chacun des 3 composés d'une sous-bibliothèque de la partition P1 est trouvé dans une sous-bibliothèque particulière de la partition P2. La première étape consiste en un criblage des 4 sous-bibliothèques de l'une des deux partitions. Si l'une de ces 4 sous-bibliothèques est active, alors on procède à la deuxième étape qui consiste en un criblage de la deuxième partition pour déterminer laquelle des 4 sous-bibliothèques de la première partition est active. Puisqu'entre deux sous-bibliothèques prises dans deux partitions orthogonales il n'y a qu'un composé désiré en commun, un composé actif peut être

immédiatement identifié comme *le* composé en commun entre les deux sous-bibliothèques actives²⁷.

C- CONCEPTION D'UNE BIBLIOTHEQUE COMBINATOIRE COMPORTANT 15625 TRIPEPTIDES ADAPTEE A LA STRATEGIE DES REPARTITIONS ORTHOGONALES.

C'est dans les toutes premières étapes de la conception d'une bibliothèque combinatoire que se décident les choix irréversibles déterminant le succès ou l'échec du projet. D'une part la stratégie chimique conditionnera la nature des composés testés, leur diversité, mais aussi le risque plus ou moins important de réactions incomplètes ou secondaires. D'autre part l'organisation de la bibliothèque en sous-bibliothèques conditionnera la facilité à mettre en évidence et à identifier un composé actif.

C-1- Choix des molécules à synthétiser.

Un avantage considérable de la synthèse combinatoire est que contrairement au cas des composés naturels, le chimiste peut maîtriser dès le départ les grandes caractéristiques structurales des produits actifs qui seront découverts à partir de sa bibliothèque.

Il peut ainsi définir certaines caractéristiques structurales, physico-chimiques ou biologiques (pas l'activité!) communes à tous les composés. La seule limite ici étant le risque de convergence excessive qui pourrait être associée à un trop grand nombre d'exigences.

C'est ainsi que nous avons dressé dès le départ un cahier des charges pour ces molécules.

i- Elles devraient avoir une masse moléculaire inférieure à 600 g mol⁻¹. Cette valeur apparemment arbitraire est expliquée par le fait qu'une molécule d'un poids moléculaire supérieur risque d'être inutilement complexe, de synthèse difficile et chère, et en plus offrir de trop nombreux sites de métabolisme et/ou de liaison, ce qui en rendrait la toxicité plus difficilement prévisible et la biodisponibilité incertaine. En outre il est improbable qu'une molécule de poids moléculaire supérieur à 600 puisse exploiter une part importante de sa

surface accessible au solvant pour interagir avec un récepteur. Un dernier élément est le risque que la molécule ne soit pas absorbée par voie orale : on sait que ce risque augmente avec le poids moléculaire.

ii- Elles devraient pouvoir interagir avec un récepteur au travers d'un large éventail de liaisons : liaisons hydrogènes, de Van der Waals, ioniques et hydrophobes.

iii- Elles auraient une solubilité dans l'eau au moins égale à 0,1 mg/mL (environ 0,2 mM), ainsi qu'une bonne stabilité métabolique.

Les techniques de synthèse en phase solide, dont nous possédons une bonne expérience au laboratoire, présentent de grands avantages, lorsqu'il s'agit de manipuler des mélanges de produits, même si la synthèse considérée ne comporte qu'un nombre limité d'étapes.

D'une part, l'emploi du support insoluble permet d'éliminer facilement les réactifs en excès et de changer de solvant en retenant l'ensemble des produits de la réaction dans le réacteur.

D'autre part, les cinétiques de couplage des acides aminés varient dans des proportions relativement limitées, ce qui n'est pas le cas avec la plupart des autres réactions organiques.

C-2- DEFINITION D'UNE BIBLIOTHEQUE CONFORME AU CAHIER DES CHARGES.

C-2-a Choix des composés.

Notre choix s'est donc porté sur une bibliothèque de tripeptides, dont on pouvait prévoir un assemblage facile sur support solide, au moyen de techniques de synthèse éprouvées.

Pour démontrer la faisabilité de la bibliothèque combinatoire, nous avons choisi de synthétiser tous les tripeptides faisables avec 25 aminoacides de série D ou achiraux (il y en a 15625). En effet, d'une part les techniques de couplage et les stratégies de protection et de clivage sont largement décrites dans la littérature et, pour la plupart d'entre elles, connues au laboratoire. En outre, l'analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale permet la caractérisation de produits purs, mais aussi de mélanges. L'emploi d'acides α -aminés permet également le contrôle de produits en mélange, par dégradation récurrente d'Edman. L'utilisation de d' α -aminoacides de série D n'implique aucun changement dans la synthèse ni dans l'analyse par rapport à la série L, puisque les réactifs utilisés, en dehors des aminoacides sont symétriques. Par contre, ces aminoacides confèrent aux tripeptides une meilleure résistance vis-à-vis des enzymes protéolytiques. Un autre avantage de ce choix est que les interactions ligand - récepteur obtenues avec des peptides constitués d'aminoacides de série D sont par nature très différentes de celles obtenues avec des peptides naturels. Des activités nouvelles sont donc attendues.

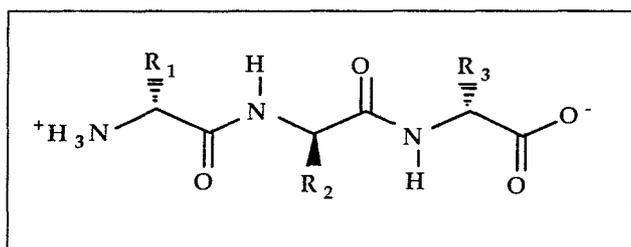


Figure 13. *Formule de Markush des structures présentes dans la bibliothèque.*

Parmi les 25 aminoacides retenus qui figurent dans la figure 14, 19 portent les chaînes latérales trouvées naturellement dans les protéines, et 6 sont non naturels. Ce choix de chaînes latérales offre un éventail large de groupements capables d'interagir avec des récepteurs biologiques (donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, charges négative et positives à pH 7, groupement aromatiques riches ou pauvres en électrons, chaînes aliphatiques).

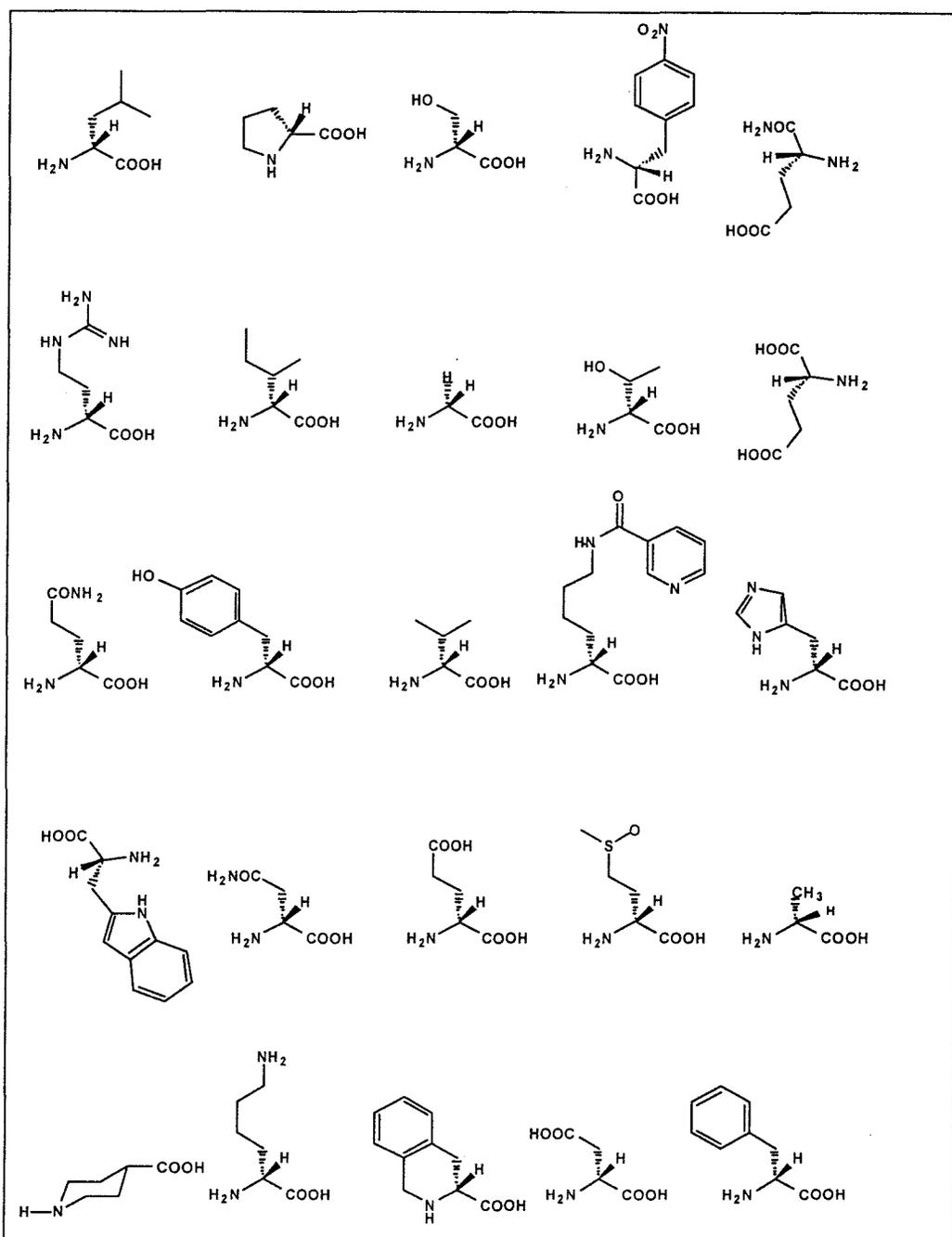


Figure 14. Les 25 aminoacides retenus.

Un dernier élément a été le choix des extrémités amino- et carboxy-terminales. L'une de nos craintes était que certains peptides portant 3 chaînes latérales très hydrophobes ne soient pas suffisamment solubles. Afin d'éviter ce risque, nous avons délibérément adopté une stratégie de synthèse conduisant à des extrémités libres, assurant la présence de deux fonctions ionisables à pH physiologique, quelle que soit le composé.

C-2-b Définition du « format ».

Les tripeptides «de série D» de la bibliothèque sont destinés à être testés à des concentrations de mélanges allant de 1 à 100 µg/mL. Ainsi, si l'on veut aisément détecter une molécule ayant une activité de l'ordre de 100 nM dans un mélange de molécules totalement inactives, il faut limiter à environ 100 le nombre des molécules testées en mélange. La bibliothèque de 15625 tripeptides doit donc être partitionnée en environ 100 sous-bibliothèques.

Par ailleurs, comme nous l'avons indiqué, le principe des bibliothèques orthogonales veut que le nombre de composé par sous-bibliothèque (n_1) soit au plus égal au nombre de sous-bibliothèques (n_2). Dans notre cas, on a donc $n_1 \cdot n_2 = n = 15625$ et $n_2 \geq n_1$. Donc le nombre de sous-bibliothèques minimal $n_{2 \min} = \sqrt{15625} = 125$.

Nous avons donc opté pour un format 125 x 125 qui permettait de respecter une dilution raisonnable des produits lors des tests biologiques.

C-2-c- Gestion de la diversité au sein des sous-bibliothèques.

Les partitions orthogonales de la bibliothèque sont réalisées lors de la synthèse. Elles sont la conséquence des deux partitions orthogonales A et B réalisées sur les 25 aminoacides. Nous utilisons des mélanges de 5 aminoacides à chaque position de la synthèse. Les sous-bibliothèques ainsi obtenues comptent donc $5^3 = 125$ tripeptides. Les 2 partitions sont organisées de manière telle qu'au sein des parties A_n et B_n de l'ensemble de 25 aminoacides, on trouve des aminoacides structurellement divers.

Tableau 2. Distribution des aminoacides.

Typiquement (tableau 2) chaque partie contient un aminoacide hydrophobe (la valine dans A3), un aminoacide hydrophile non chargé (comme la sérine), un aromatique (comme l'acide tétrahydroisoquinoléinecarboxylique « Tic ») un aminoacide chargé (comme l'acide glutamique) et un aminoacide non naturel ou sans chaîne latérale (comme la glycine ou l'acide isonipécotique). Les sous-bibliothèques de tripeptides issues de la combinatoire d'aminoacides les plus divers sont les plus diverses possible. En effet leur complexité N vaut 125, et le nombre n de variants utilisés est compris entre de 5 et 15, le rapport N/n est donc compris entre 8.3 et 25. Ce qui est bien inférieur au rapport obtenu dans l'exemple du chapitre précédent : $N/n = 8000$ (160000 hexapeptides fabriqués avec 20 variants).

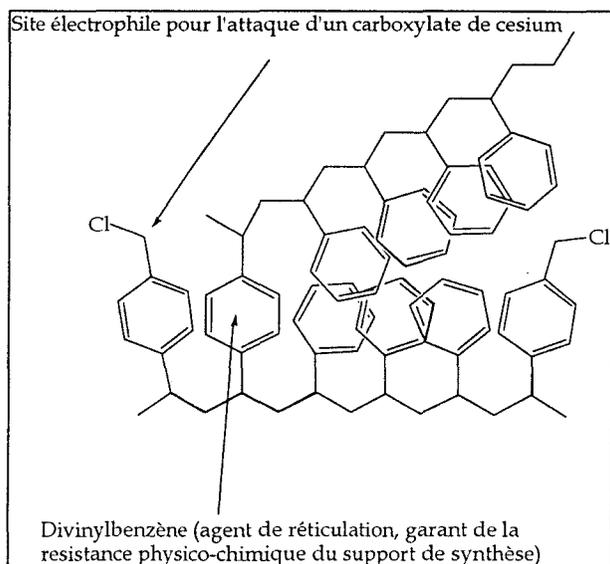
Ainsi, si une sous-bibliothèque est active, il est peu probable que cette activité soit due au cumul des activités de congénères structurellement proches. Et il est raisonnable d'espérer trouver *une seule* structure active dans cette sous-bibliothèque.

D- PREPARATION DE LA BIBLIOTHEQUE. SYNTHÈSE DES TRIPEPTIDES.

Les deux séries-partitions ont été réalisées selon les mêmes protocoles, utilisant les mêmes résines, le même agent de couplage (HBTU) et la même stratégie de protection (tBoc/benzyle).

Cette stratégie présentait l'avantage d'être bien documentée, bien maîtrisée au laboratoire, et d'utiliser des réactifs largement diffusés et donc peu chers : les aminoacides protégés par un groupement tBoc sur l'amine α et par un groupement de type benzyle sur la chaîne latérale si nécessaire.

D-1- synthèse en phase solide : l'ancrage dans la stratégie tBoc - benzyle.



Le polymère utilisé est le polymère dit de Merrifield²⁸. il s'agit d'un polystyrène réticulé avec 2% de divinylbenzène, et fonctionnalisé par chlorométhylation. Ce polymère est commercialement disponible. Il est peu cher et ses propriétés étaient bien connues au laboratoire.

Figure 15. Structure du polystyrène utilisé comme support de synthèse en phase solide.

Selon la méthode décrite par Merrifield, la synthèse peptidique en phase solide s'effectue de manière récurrente, en fixant sur le support polymérique, les différents dérivés d'acides aminés protégés, du résidu carboxyterminal au résidu aminoterminal, selon l'ordre dicté par la séquence du peptide à synthétiser. Cette stratégie est illustrée par la figure 16.

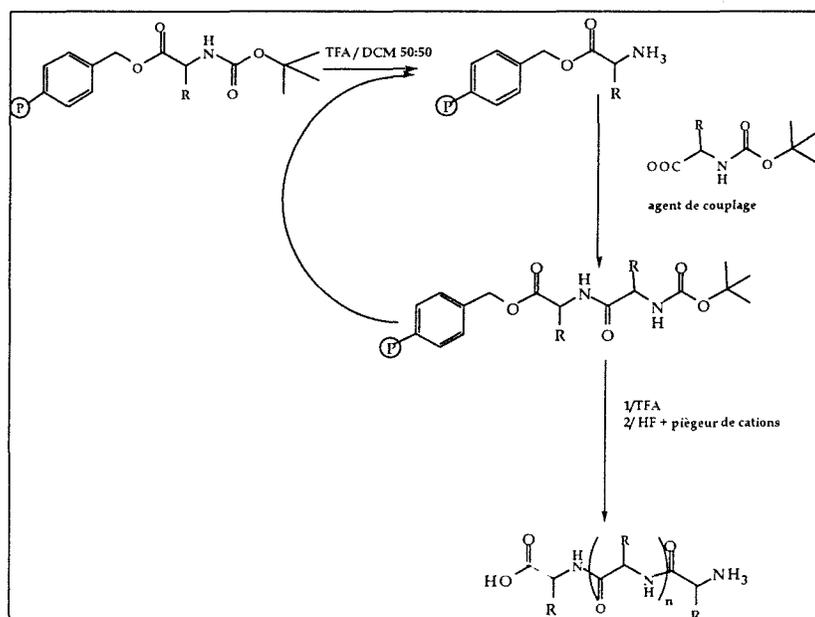


Figure 16. Synthèse en phase solide.

D-2 Ancrage.

Le premier résidu a été fixé au polymère par l'intermédiaire d'une liaison ester de type benzylique. Cette liaison est réalisée en faisant gonfler le polymère chlorométhylé dans une solution de l'acide aminé sous forme de sel de Césium dans le DMF, à une concentration d'environ 0,1 M (saturation).

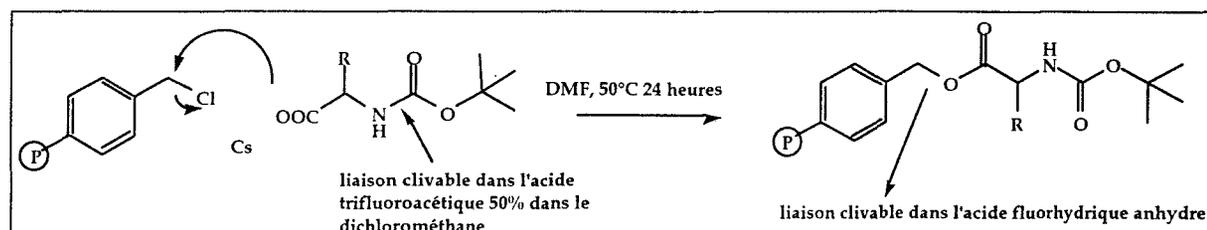


Figure 17. Ancrage au polymère par estérification au ions nus.

Pour cette étape, où les différents aminoacides protégés ont des réactivités très variées, les 25 couplages ont été effectués séparément, et contrôlés un par un. Les rendements de couplage ont été évalués par dosage des ions chlorures libérés de la résine par action du sel de Césium. Le dosage s'effectue sur le résidu d'évaporation des solutions de lavage après réaction, à l'aide de la méthode par retour de Charpentier - Volhard. Les chlorures sont précipités par un excès de nitrate d'Argent. L'excès d'ions Argent est dosé par l'isothiocyanate de Potassium, en présence d'alun de Potassium. Les rendements s'échelonnent entre 66% (tBoc - D Arg (Tos)-OH) et 99 % (tBoc - D Met(O)-OH) et les charges des aminoacyl-résines obtenues se répartissent entre 0,32 mEq/gr (pour l'Asparagine-trityle) à 0,64 mEq/gr pour la Glycine.

Il faut citer ici la difficulté de couplage rencontrée avec la tBoc-Asparagine. La faible solubilité de son sel de Césium diminue beaucoup les concentrations utilisables et par conséquent les cinétiques. Il nous a fallu « modifier » cet aminoacide par substitution d'un atome d'hydrogène du carboxamide de la chaîne latérale par un groupement trityle. Cette modification, clivable en milieu acide (TFA), permet non seulement de faciliter l'ancrage à la résine, mais aussi de réaliser le couplage de l'Asparagine à l'aide de l'HBTU.

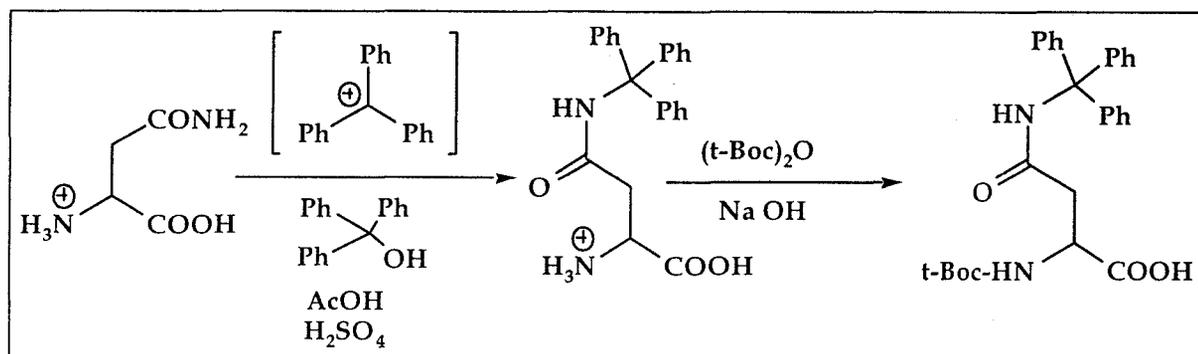


Figure 18. *N*β-Alkylation et *N*α protection de l'Asparagine.

D-3 Déprotection du tBoc

Les déprotections des groupements t-Boc ont toujours été réalisées juste avant l'étape de couplage, pour éviter les réactions secondaires impliquant la nucléophilie de l'amine engendrée.

Sur des lots de résine ayant séjourné plusieurs jours après déprotection avant le couplage, nous avons observé la cyclisation des glutamines en résidus pyroglutamiques, qui provoque un blocage de l'élongation de la chaîne peptidique. Cette réaction est favorisée en milieu acide faible tel qu'on l'obtient après la déprotection à l'acide trifluoroacétique et les lavages.

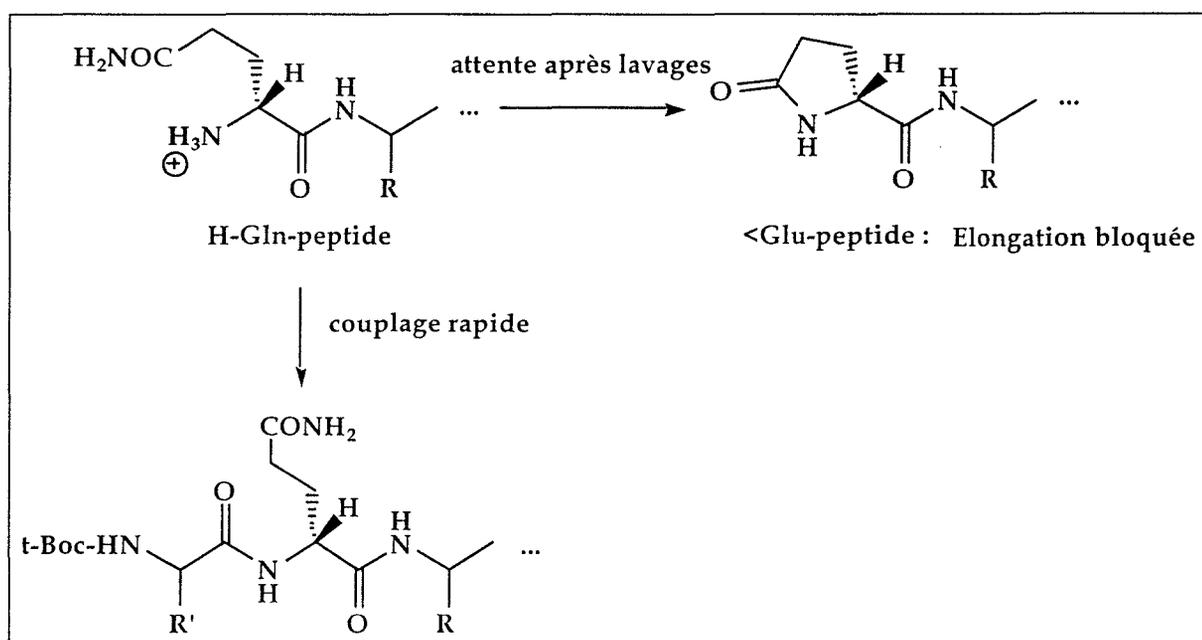
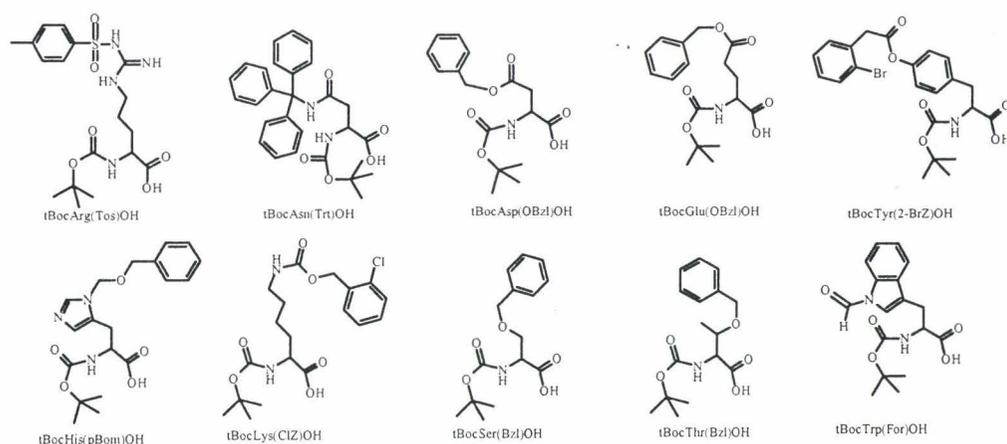


Figure 19. Réaction de terminaison de chaîne par cyclisation d'une glutamine aminoterminale en milieu acide faible.

La réaction a pu être mise en évidence grâce à une dégradation récurrente d'Edman, réalisée sur un lot de résine ayant séjourné plusieurs jours déprotégé avant l'acylation. En effet, au cycle de dégradation correspondant, le PTH correspondant à la glutamine est absent.

D-4- Protections des chaînes latérales des aminoacides, orthogonales au tBoc.

Ces protections ont été choisies pour résister au TFA à 50% dans le dichlorométhane mais clivables dans par l'acide fluorhydrique anhydre en présence de pièges à cations. Pour la plupart, elles sont basées sur le radical benzyle.



Les acides Glutamiques ont été utilisés protégés sous forme d'esters benzyliques α ou γ , de manière à utiliser respectivement pour le squelette « peptidique » l'acide de la chaîne latérale ou l'acide γ . L'acide Aspartique a été utilisé sous forme d'ester benzylique. La fonction guanidine de l'Arginine a été protégée par un groupement Tosyle. La Sérine et la Thréonine ont été utilisées sous forme d'éther benzyliques. La Tyrosine a été protégée par un groupement 2-Bromo-benzyloxycarbonyle (2-BrZ), carbamate clivable également en milieu acide et empêchant l'alkylation du noyau phénolique par réaction de Fries²⁹. La Lysine quant à elle, a été protégée par un carbamate : le 2-Chlorobenzoyloxycarbonyle (2-ClZ). L'Histidine a été protégée par un groupement π -Benzyloxyméthyle (π -Bom). Enfin, le noyau indolique du tryptophane a été protégé par un groupement N-Formyle, seule protection non labile en milieu acide, mais clivable par des nucléophiles comme le diméthylsulfure (procédure « LowHF »³⁰) ou la pipéridine. La plupart de ces dérivés protégés des aminoacides étaient

commerciallement disponibles à l'époque de la préparation de cette bibliothèque. Seules la t-Boc D-Asparagine(trityle)-OH et la t-Boc D-Methonine(O)-OH ont du être préparées au laboratoire.

D-5- Couplages des acides aminés.

Pour activer les groupements acides, un réactif réputé pour son efficacité et son faible pouvoir racémisant a été utilisé. Il s'agit de l'HBTU, dérivé relativement stable de la tétraméthylurée (et non de l'hexaméthylphosphorotriamide réputé cancérigène comme le BOP), assez peu hygroscopique, et bien soluble dans les solvants polaires aprotiques. Nous l'avons utilisé en solution dans le diméthylformamide en présence de 1-Hydroxybenzotriazole et de Diisopropyléthylamine. (NB : l'HBTU est beaucoup plus soluble dans le DMF que dans la N-méthylpyrrolidone, c'est pour cette raison, qu'en dépit de la moindre toxicité de cette dernière, nous avons choisi le DMF comme solvant de toutes les synthèses).

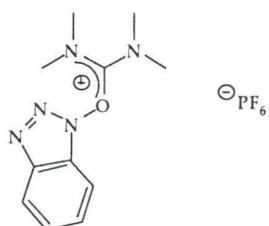


Figure 21. L'HBTU

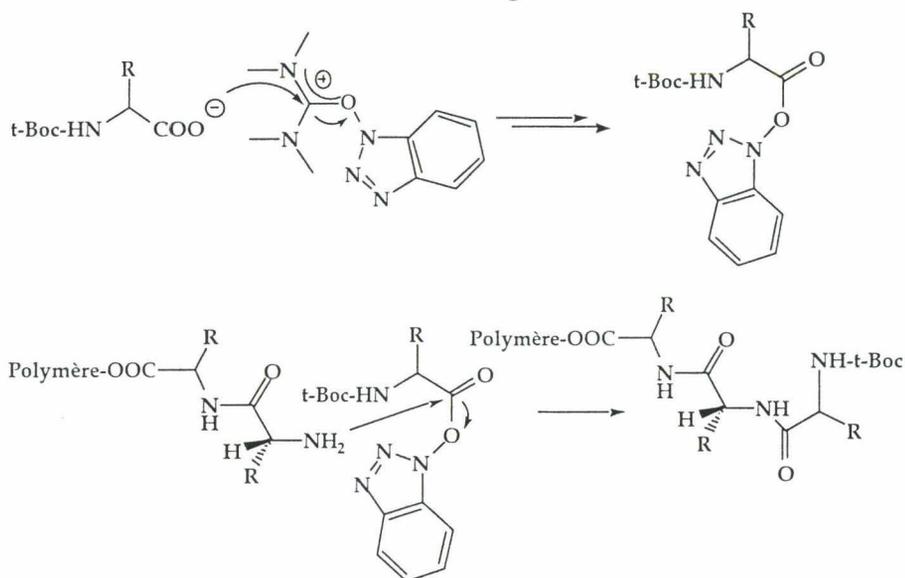


Figure 22. Réactions d'activation et de couplage à l'aide de l'HBTU.

Les couplages ont été réalisés avec 1,1 Eq d'espèce activée en mélange par rapport aux fonctions amines libres nucléophiles présentes sur la résine. L'efficacité des étapes de couplage a été contrôlée par le test quantitatif de Troll-Kaiser à la ninhydrine, sur des

échantillons lavés séchés et pesés de résine. 0,1 Eq de réactif en excès permet dans 95% des cas d'obtenir un taux d'amines libres résiduel inférieur au seuil de détection du test après 1 heure de couplage, sans compromettre la stœchiométrie du mélange d'amides obtenu. Quoiqu'il en soit, un double couplage systématique a été effectué.

Il faut remarquer que si l'on évite la mauvaise incorporation d'un aminoacide lent, on ne peut éviter la formation de couples préférentiels, par exemple les couples bon nucléophile - bon électrophile et faible nucléophile - faible nucléophile. La formation de ces couples préférentiels ne peut s'évaluer en analyse d'acides aminés, ni par séquençage des peptidylrésines. Et le seul moyen de l'éviter est d'utiliser la méthode DCR, qui est beaucoup moins rapide.

Néanmoins, nous avons réalisé une analyse par HPLC d'une sous-bibliothèque et nous avons pu dénombrer plus de 80 pics d'intensités comprises dans une fourchette d'intensités relatives de 1 à 10.

Ceci plaide en faveur de la réalisation d'un bon nombre des combinaisons attendues. Dans la majeure partie des cas, un seul couplage avec 1,1 Eq d'espèce acylante a été suffisant pour négativer le test de détection d'amine selon Kaiser³¹. (Ce n'est *jamais* le cas avec 1.0 Eq d'espèce acylante, et cela justifiait d'employer 1,1 Eq). Dans le cas où le couplage s'effectuait sur les groupes A1, A2, B1 ou B5 qui contiennent des amines secondaires, un test coloré à l'acétone/chloranyle a été réalisé³².

Les analyses d'acides aminés réalisées sur 10 sous-bibliothèques déprotégées et clivées ont montré que la plupart des acides aminés étaient présents dans une fourchette de 10% autour de la valeur attendue, et que les plus divergents étaient à moins de 25% de la valeur attendue (tableau 3).

145	Leu	Arg	Glu	Trp	Lys		Asp	His	Ala	Phe		
théor.	1	1	3	1	1		1	1	1	1		
observ.	1,3	0,9	2,9	1,3	1,1		1,3	0,7	1,2	0,9		
151	Leu	Arg	Glu	His	Ala	Phe						
théor.	2	2	4	1	1	1						
observ.	2,5	1,9	3,6	1,1	1,0	1,0						
243	Pro	Ile	tyr	Asp	Lys	Thr		Ser	Gly	Val	Glu	
théor.	1	1	1	2	2	1		1	1	1	1	
observ.	1	1	0,7	2	2,3	0,8		0,9	1,0	0,9	1,0	
244	Pro	Ile	tyr	Asp	Lys	Thr						
théor.	1	1	1	3	3	2						
observ.	0,9	1	0,6	3	3,5	1,9						
251	Pro	Ile	tyr	Asp	Lys	Glu	His	Ala	Phe	Leu	Arg	
théor.	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	
observ.	1,0	0,9	0,9	0,9	1,2	3,3	1,0	1,0	0,9	1,1	0,8	
344	Ser	Gly	Val	Glu	Thr	Lys		Asp				
théor.	1	1	1	1	2	2		2				
observ.	1,0	1,0	1,2	1,1	1,5	2,1		1,8				
451	Thr	Lys		Asp	Glu	His	Ala	Phe	Leu	Arg		
théor.	1	1		1	3	1	1	1	1	1		
observ.	0,9	1,1		0,8	3,3	1,0	1,1	0,9	1,2	0,8		

Tableau 3

D-6- Déprotections.

Après la synthèse, *toutes* les résines ont subi une étape de déformylation à la pipéridine (même si elles ne contenaient pas de Tryptophane). Ce traitement, nécessaire à la déprotection

de l'indole du Tryptophane a été appliqué à toutes les sous-bibliothèques, qu'elles aient ou non contenu ce résidu. Ce choix a été déterminé par le souci d'homogénéiser les traitements chimiques appliqués aux échantillons, et d'identifier plus aisément d'éventuelles réactions secondaires.

Après une déprotection de l'amine α -terminale, les 125 peptidylrésines ont été soumises à un traitement par l'acide fluorhydrique anhydre contenant 7,5% de paracrésol et 2,5% de parathiocrésol, à 0°C, pendant 1 heure. (Protocole High HF ³³)

Dans ces conditions, qui font appel une forte concentration d'acide fluorhydrique (90%), les protections sont clivées par des mécanisme de type SN1 qui engendre des cations de type benzylique. Compte tenu de la réactivité propre de ces carbocations, on introduit dans le milieu réactionnel 10 % de pièges à cations pour protéger les fonctions fragiles des peptides (ici les noyaux phénoliques et indoliques, les alcools et les acides principalement). Les pièges que nous avons utilisé sont le paracrésol et le parathiocrésol. Etant donné le nombre de déprotections à réaliser (250) , nous avons mis au point un système à 24 réacteurs, permettant, moyennant une bonne organisation, de réaliser à deux, en une journée de travail, 24 coupures HF (suivies des retraitements).

D-7- principe de couplage pour l'obtention des deux série-partition de 125 sous-bibliothèques de 125 tripeptides.

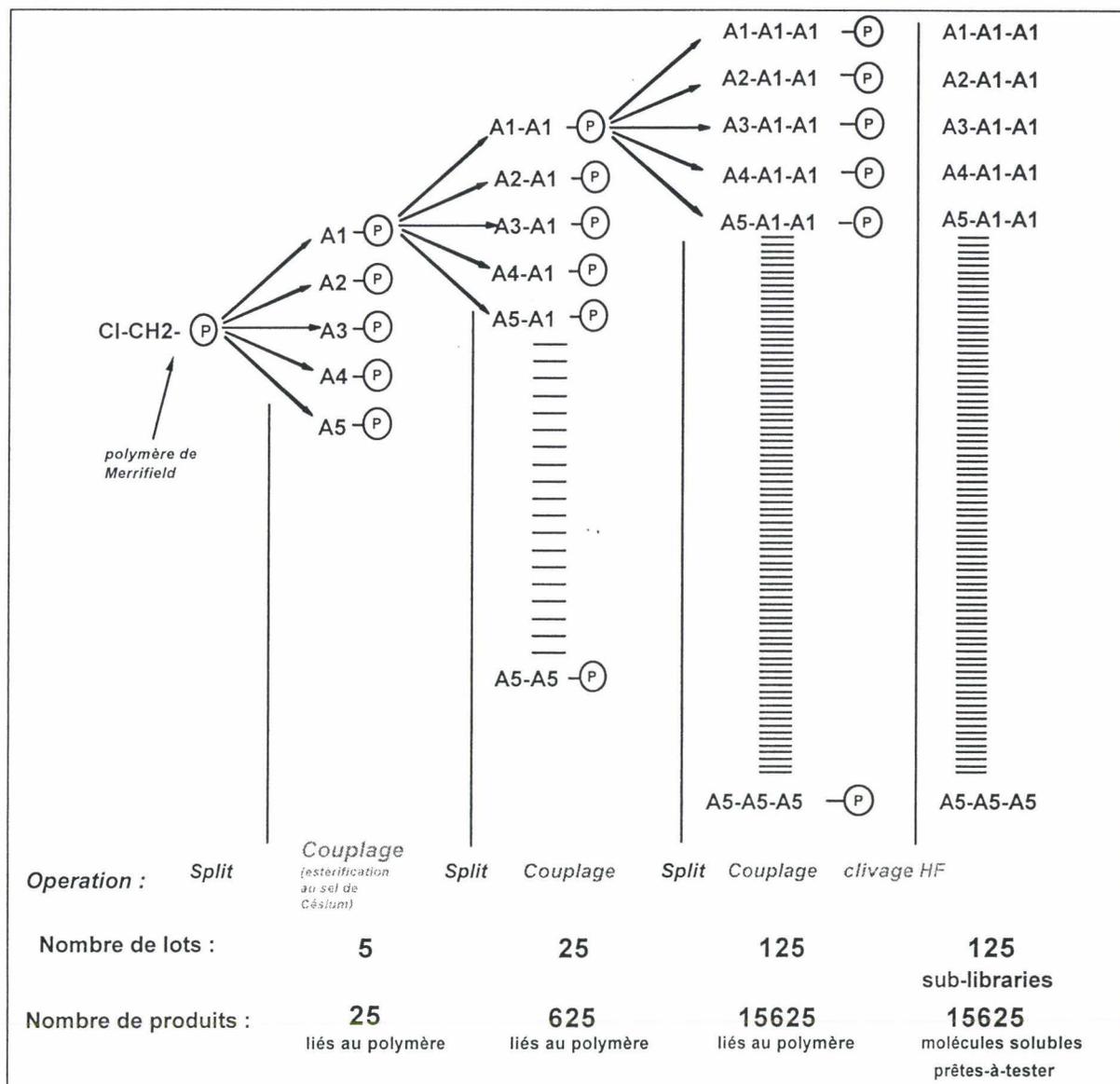


Figure 23. Elaboration de la bibliothèque.

La figure 23 résume les différentes opérations effectuées pour obtenir la première série partition.

Dans un premier temps, les aminoacyl-résines obtenues par estérification ont été mélangées 5 par 5 en stœchiométrie. Selon les groupes figurant dans le tableau 4

	A1	A2	A3	A4	A5
	D-Leu	D-Pro	D-Ser	D-Pnp	D-Igu
	D-Arg	D-Ile	Gly	D-Thr	D-Ign
	D-Gln	D-Tyr	D-Val	D-Nic	D-His
	D-Trp	D-Asn	D-Glu	D-Mto	D-Ala
	Ipe	D-Lys	D-Tic	D-Asp	D-Phe

B1	{	D-Leu	D-Pro	D-Ser	D-Pnp	D-Igu
B2	{	D-Arg	D-Ile	Gly	D-Thr	D-Ign
B3	{	D-Gln	D-Tyr	D-Val	D-Nic	D-His
B4	{	D-Trp	D-Asn	D-Glu	D-Mto	D-Ala
B5	{	Ipe	D-Lys	D-Tic	D-Asp	D-Phe

Tableau 4. *Les deux partitions d'acides aminés utilisées pour la réalisation des deux séries partitions de 125 sous-bibliothèques de 125 tripeptides.*

Ensuite, ces 5 mélanges ont été divisés en 5 fraction égales. Plusieurs méthodes ont été expérimentées : la division pondérale de résine mouillée essorée, la division volumétrique d'une suspension de résine dans un mélange de solvants isopycnique, ou l'utilisation d'un appareil conçu au laboratoire, qui permet de diviser une couche de résine flottant en surface d'un solvant en 5 part égales.

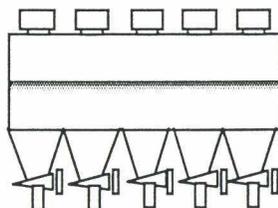


Figure 24. *Schéma de l'appareil conçu pour diviser des surfaces de résines en parties égales.*

La méthode la plus fiable et la plus simple à mettre en œuvre manuellement est la première et c'est celle-là qui a été utilisée pour toutes les étapes de division.

Chacun des 5 lots d'aminoacylrésine a été couplé à 1,1 Eq d'un mélange stœchiométrique d'acides aminés. A l'issue des ces 5 couplage, chacun des 25 lots de dipeptidylrésine a été couplé a été divisé en 5 parts égales et chacune de ces part, couplée à un mélange d'acides aminés. Les 125 tripeptidylrésines obtenues après ce deuxième couplage ont été "déformylées", déprotégées en α et soumises à un clivage HF, pour donner 125 poudres solubles après lyophilisation.

Les mêmes manipulations ont été réalisées avec les mélanges orthogonaux d'acides aminés pour obtenir la série partition orthogonale B.

E- LE CRIBLAGE BIOLOGIQUE.

Une série de tests biologiques a été réalisée sur les mélanges ainsi obtenus. Parmi les nombreux tests retenus pour évaluer notre bibliothèque plusieurs impliquaient des récepteurs dits à 7 domaines transmembranaires (7TM). Dans cette famille figurent des récepteurs de haut poids moléculaires (35 à 50 kDa) impliqués dans des fonctions pharmacologiques majeures aussi diverses que la régulation de la pression sanguine, de l'inflammation, des nombreuses voies du système nerveux central

Le tableau 5 réunit quelques uns des récepteurs 7TM dont l'implication dans des processus physiopathologiques est établie et qui constituent des cibles pharmacologiques potentielles.

Domaine Thérapeutique	Récepteur ³⁴	Ligands naturels	Nature chimique	Poids moléculaire
	A ₁ , A ₂ , A ₁	Adénosine	Purine	267
Tension artérielle	V1, V2	Vasopressin	Peptide	1084
Tension artérielle, Asthme...	α , β	Adrénaline	Catécholamine	183
Tension artérielle	AT ₁ , AT ₂	AT2	Peptide	1046
Tension artérielle	B ₁ , B ₂	Bradikinine	Peptide	1060
Immunologie	IL8 _A , IL8 _B	Interleukine IL8	Peptide	

	CCK _A , CCK _B	Cholecystokinine	Peptide	>1000
Système Nerveux Central	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , D ₅	Dopamine	Amine aromatique	<200
Système Cardio Vasculaire	ET _A , ET _B	Endotheline	Peptide	>2000
Système Nerveux Central	kainate	Acide kainaique	Aminoacide	213
Système Nerveux Central	mGlu _{1 à 7}	Acide glutamique	Aminoacide	147
Ulcères, Allergie	H ₁ , H ₂	Histamine	Amine aromatique	111
Système Nerveux Central	5-HTn sauf 5-HT ₃	Sérotonine	Amine aromatique	178
Pression artérielle, Appétit	Y ₁	NPY	Peptide	4271
Système Cardio Vasculaire, sommeil thermorégulation,	ML ₁ , ML ₂	Mélatonine	N-acétyl, 5-hydroxy- Tryptamine	232
Douleur	μ, δ, κ	Endorphines	Peptides	>1000
Inflammation	PAF-receptor	Platelet Activating Factor	« Lipide » : βacétyl -γ-O-alkyl -α-phosphatidyl-choline	550-570
Inflammation	TP	Thromboxane	Prostanoïde	370
Inflammation	EP ₁ , EP ₂ , EP ₃	Prostaglandines	Prostanoïde	300-400
Endocrinologie	SRIF ₁ , SRIF ₂	Somatostatine	Peptide	1638
	VIP ₁ , VIP ₂	VasoActiveIntestinal Peptide	Peptide	3326
Douleur	NK ₁ , NK ₂ , NK ₃	Substance P	Peptide	1348

Tableau 5. Principaux récepteurs à 7 domaines transmembranaires.

Ces récepteurs ont des séquences comptant de 350 à plus de 500 aminoacides. Sept domaines transmembranaires de 20 à 25 offrent une surface potentielle de liaison concave de surface étendue³⁵. L'implication simultanée de plusieurs domaines non contigus de la séquence primaire dans l'interaction avec les ligands naturels, les interactions complexes avec la membrane plasmique en rendent l'élucidation structurale très difficile. Dans ces conditions, au moins pour ceux de ces récepteurs qui ont pour ligands naturels des peptides, la découverte de nouveaux ligands non peptidiques agonistes ou mêmes antagonistes relèvent, dans l'état actuel de nos connaissances structurales, de la pure utopie. Seul le criblage systématique de petites molécules organiques, d'origine synthétique ou naturelle, permet de trouver de nouveaux composés actifs. Pour les récepteurs ayant des ligands non peptidiques, des stratégies de

mimes structuraux des ligands peuvent être fructueuses³⁶. Dans ces circonstances, il nous a semblé opportun de tester les tripeptides sur plusieurs récepteurs de cette superfamille.

Les résultats concernant deux de ces récepteurs, V2 et CCKB sont détaillés ci-après.

E-1- Principe général.

Pour l'ensemble de ces tests, la stratégie générale a été la suivante.

- Pour chaque test, une douzaine de sous-bibliothèque de la première bibliothèque A, prises au hasard, sont testés a trois concentrations : 6.25, 25 et 100 mg/mL Le but de cette première évaluation est de déterminer le signal moyen engendré par les mélanges dans chaque test. C'est lui qui permettra de déterminer la concentration de travail pour chaque test.

- dans une deuxième étape, la bibliothèque A, comportant 125 échantillons est évaluée dans un premier temps à la concentration déterminée auparavant.

- dans une troisième étape, si une sous-bibliothèque est identifiée comme active, les 125 sous-bibliothèques de la bibliothèque B sont criblées de manière identifier le composé actif.

- dans une dernière étape, le composé identifié par l'intersection des deux sous-bibliothèques est synthétisé, purifié, caractérisé et son activité est évaluée.

L'expérience a montré qu'à chaque fois qu'une activité dans A n'était pas associée à une activité dans B, aucun composé actif n'est obtenu par déconvolution de la sous-bibliothèque active de A.

E-2- Exemple d'un test négatif :

Nous avons effectué des tests de liaison au récepteur de la Cholécystokinine CCKB. Le ligand de référence est la CCK8. Les résultats obtenus lors de la détermination de la concentration de travail sont indiqués dans le tableau 6.

s/s bibliothèque	6,25 µg/mL	25 µg/mL	100 µg/mL
114	-	-	-
115	-	-	-
214	-	-	-
221	-	-	-
315	-	-	-
321	-	-	-
323	-	-	-
413	-	-	-
423	-	-	-
513	-	-	17

Tableau 6. Le signe "-" indique une inhibition inférieure à 10%.

Etant donné le faible bruit de fond obtenu, les 125 sous-bibliothèques de A ont été testées à la plus forte concentration : 100 µg/mL. La plus forte inhibition obtenue fut de 30%. La bibliothèque B n'a donc pas été criblée.

E-3- Exemple d'un test positif.

Nous détaillons ici les résultats obtenus sur un test de déplacement de la Vasopressine tritiée du récepteur V2 de porc.

s/s bibliothèque	6,25 µg/mL	25 µg/mL	100 µg/mL
114	11	14	49
115	-	-	21
214	-	-	13
221	-	17	33
315	-	-	-
321	22	-	14
323	-	19	-
413	22	73	91
423	74	90	82
513	15	23	58

Tableau 7 : Pourcentage d'inhibition de liaison spécifique obtenus avec les différentes molécules sur les récepteurs V2. Le ligand de référence est l'Arginine-Vasopressine (IC50 = 4,7-5,2 nM.). Le signe "-" indique une inhibition inférieure à 10%.

La concentration la plus discriminante semble être 25µg/mL. Toutes les sous-bibliothèques ont donc été reprises dans le DMSO, puis diluées dans le tampon d'expérimentation à une

concentration de 25 μ g/mL, correspondant approximativement à 0,2 μ g/mL (0,5 μ M) de chaque tripeptide. Les résultats suivants ont été obtenus :

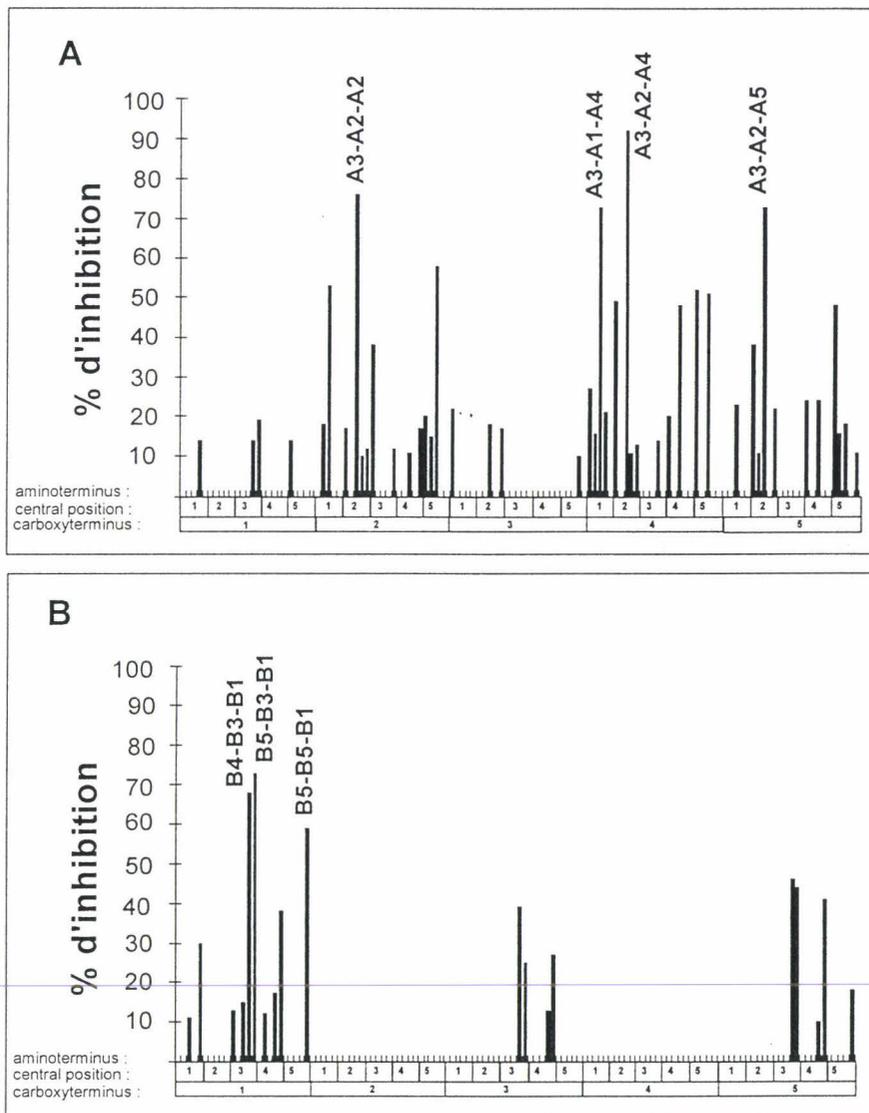


Figure 25. Résultats du criblage sur le récepteur V2 de la vasopressine.

Ce criblage initial des deux séries-partitions (A et B) permet de sélectionner 6 (3 +3) sous-bibliothèques capables d'inhiber à plus de 60% l'inhibition de la liaison de la vasopressine tritiée à son récepteur. Cette sélection définit 9 (3 x 3) composés susceptibles d'être actifs. Afin de restreindre le choix, nous avons retesté ces 6 sous-bibliothèques à la concentration de 2,5 μ g/mL et, dans ces conditions, seule A3-A2-A4 est restée active parmi les sous-bibliothèques de la première partition, alors que B5-B3-B1 et B4-B3-B1 restaient actives dans

la deuxième partition. Le tripeptide en commun entre A3-A2-A4 et B5-B3-B1, définit comme $\{A3 \cap B5\} - \{A2 \cap B3\} - \{A4 \cap B1\}$ est H-DTic-DTyr-D(4-nitro)Phe-OH:

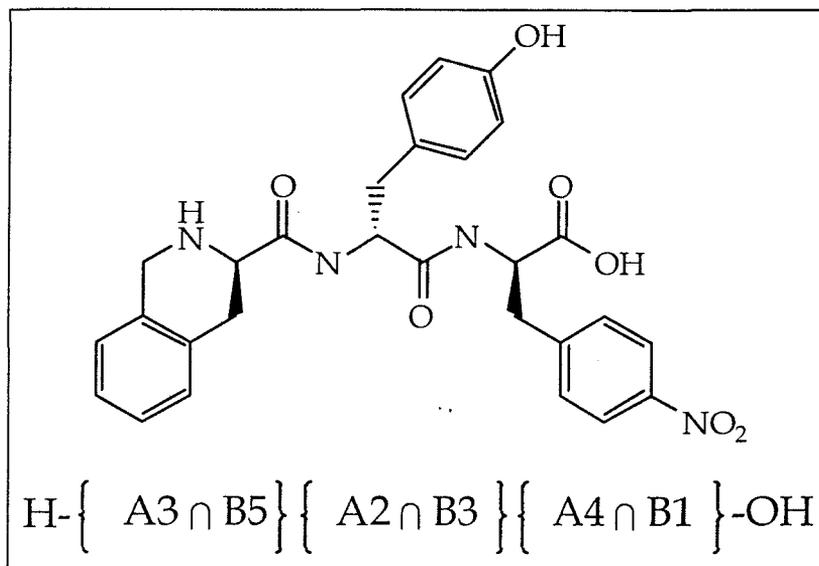


Figure 26. Produit en commun entre A3-A2-A4 et B5-B3-B1.

Ce tripeptide a également été mis en évidence par un scanning de position réalisé sur la sous-bibliothèque A3-A2-A4.

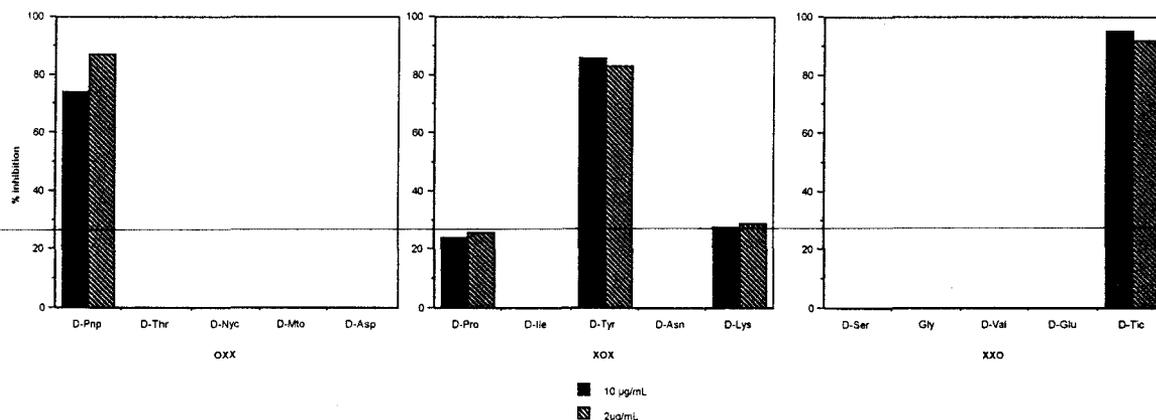


Figure 27. Résultats de la déconvolution par « scanning » de position.

Au vu de ces résultats, une synthèse classique de H-DTic-DTyr-D(4-nitro)Phe-OH a été entreprise. Un protocole de synthèse calqué sur celui qui a été utilisé pour la préparation des bibliothèques a été utilisé. Le lot de résine tBoc-DPhe (4-nitro)-O-Polymère préparé pour les bibliothèques a été réutilisé et les deux aminoacides tBoc DTyr (2BrZ)-OH et tBoc DTic-OH ont été couplés l'un à la suite de l'autre en utilisant une procédure identique à celle employée pour les bibliothèques (HBTU/ HOBt). Les mêmes procédures de déprotection et de clivage

ont été utilisées. Un produit de très bonne pureté a été obtenu à l'issue du clivage HF (Figure 28).

Figure 28. Analyse du tripeptide actif (brut de synthèse). 1- électrophorèse capillaire. 2- HPLC en phase inverse.

Ce tripeptide s'est révélé actif dans le test de liaison utilisé pour le criblage de la bibliothèque, avec une IC₅₀ (par rapport à l'AVP 3 nM) de 63 nM.

De manière à déterminer si le produit trouvé était agoniste ou antagoniste, nous avons procédé à un test fonctionnel, dans lequel on détermine la quantité d'AMP cyclique présent dans la cellule après exposition au produit, en compétition avec des doses croissantes de ligand naturel. L'inhibition d'activation de l'adénylate cyclase (IC₅₀ = 210 nM) qui a pu être mise en évidence par ce test montre que le tripeptide H-Dtic-DTyr-D(4-nitro)Phe-OH est un ligand antagoniste du récepteur V₂ de la vasopressine.

E-4 Ebauches de relations structure - activité.

Ayant défini plusieurs structures actives à l'aide de cette bibliothèque, nous avons pu réaliser l'ébauche d'une étude de relation structure activité. A l'issue du criblage d'une bibliothèque combinatoire, deux possibilités s'offrent au pharmacochimiste : soit il sélectionne de

nouveaux synthons proches des synthons du produit actif et resynthétise une bibliothèque combinatoire dite focalisée, soit il abandonne la stratégie combinatoire et attaque un travail classique de synthèse. Dans le cas où une activité relativement faible a été mise en évidence dans la première bibliothèque, il est judicieux de réaliser une seconde bibliothèque combinatoire focalisée, pour explorer très rapidement, mais grossièrement, l'espace des structures chimiques proches de la « touche ». Par contre, dans un cas comme le nôtre où une activité nanomolaire est « sortie » de la bibliothèque primaire, il est préférable de passer directement à une étude classique de relations *quantitatives* entre les structures et les activités. Pour réaliser cette étude quantitative, il faut non seulement que les produits testés soit purs et caractérisés (ce qui peut se faire de manière automatique et combinatoire) mais aussi que l'on puisse évaluer la quantité de matière introduite dans le test. Dans ce cas, seule la pesée des produits permet de les quantifier, puisqu'ayant à faire à des produits nouveaux, nous ne disposons d'aucune de leurs caractéristiques physico-chimiques ($\lambda_{max.}$, $\epsilon...$).

Une série de 20 composés - synthétisés et purifiés par Xavier Williard et Line Bourel au cours de leur stage pratique de DEA- ont donc été testés pour leur capacité à inhiber la liaison de la vasopressine au récepteur V2. Les groupements benzéniques ont été remplacés par des cycles isostères, tout comme leur substituants. De même les centres asymétriques ont été inversés un à un et les 7 isomères optiques ont été testés. Des analogues plus courts ont été synthétisés, ainsi que des analogues dans lesquels les charges amino et carboxyterminales ont été masquées.

Un seul dérivé a été trouvé plus actif que le tripeptide présent dans la bibliothèque : il s'agit de l'analogue dans lequel le groupement nitro- a été remplacé par un atome de chlore.

F- EVALUATION CRITIQUE. NOUVELLES DIRECTIONS A PRENDRE.

Si l'identification de l'antagoniste de la vasopressine a permis de démontrer clairement la validité de la méthode de bibliothèques orthogonales, un examen critique nous a amenés à modifier sensiblement notre stratégie de synthèse combinatoire.

F-1- Existence d'un "faux positif".

Le tripeptide commun à A3-A2-A4 et B4-B3-B1, H-DGlu-D-Tyr-D(4-nitro)Phe-OH, analogue du précédent dans lequel le résidu D-Tic est remplacé par un acide D-Glutamique a été préparé mais s'est révélé totalement inactif. Ce dernier aminoacide avait été défini comme l'acide aminé commun à A3 et B4. Mais un récepteur ne discrimine pas entre une identité et une ressemblance presque parfaite. La notion d'identité n'est pas une notion naturelle. Si, entre deux groupes d'acides aminés, l'acide aminé en commun est un élément pouvant participer à la liaison, alors le principe de l'orthogonalité fonctionne et l'on trouve un produit actif dans l'intersection des deux sous-bibliothèques en question (intersection au sens mathématique du terme). Par contre, il est possible que l'acide aminé commun aux deux groupes ne puisse pas participer à la liaison, mais qu'il existe un acide aminé d'un groupe structuralement proche - *mais non identique* - à un autre acide aminé dans l'autre groupe. Dans ce cas, les deux sous-bibliothèques en question sont actives mais leur intersection est inactive. Dans l'une et l'autre des deux sous-bibliothèques, c'est bien deux produits non identiques mais structuralement proches, qui sont actifs. Il faudrait considérer l'intersection en sens de la « logique floue »³⁷, c'est-dire l'intersection *stricto sensu* et les satellites de l'intersection qui sont les couples de composés voisins.

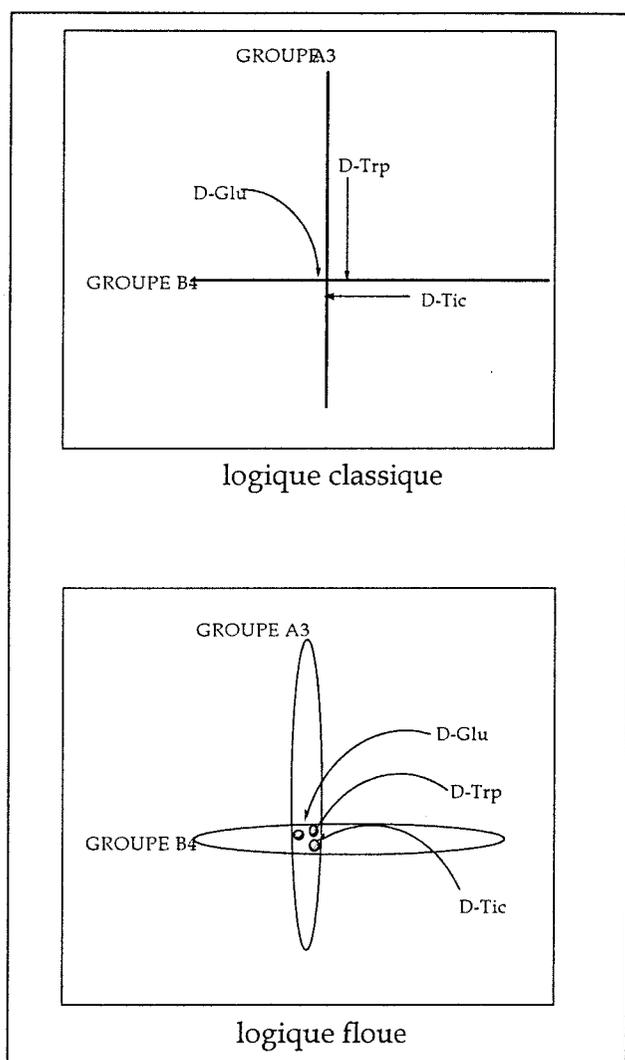


Figure 19.

Dans notre cas il est probable que le produit actif dans B4-B3-B1 était D-Trp-D-Tyr-D-Pnp, formant avec D-Tic-D-Tyr-D-Pnp un couple de produits non identiques mais analogues. Par la suite en effet, nous avons montré, en le synthétisant, que le tripeptide D-Trp-D-Tyr-D-Pnp présentait un IC 50 de 5 μ M.

F-2- Diversité et organisation des sous-bibliothèques.

L'examen des résultats biologiques montre clairement que plusieurs sous-bibliothèques recèlent des composés actifs. D'une manière schématique, si l'on admet que le pharmacophore V2 peut se définir aussi simplement que par « H-D-Aromatique - D-Aromatique - D-Aromatique -OH », alors notre set de 25 aminoacides est beaucoup trop redondant. Si cela avait été exact, toutes les sous-bibliothèques se seraient révélées positives, puisque chacun des

groupes de 5 aminoacide contenait un aminoacide aromatique! Dans ce cas, en dépit d'un signal important, notre méthode aurait été totalement inefficace pour identifier produits actifs. Il est néanmoins sûrement possible de s'affranchir de ce problème en introduisant une contrainte supplémentaire lors de la conception des deux partitions orthogonales. Dans le cas décrit ici, nous avons décidé de constituer les deux partitions orthogonales en appliquant la même règle de partage, c'est-à-dire en rassemblant des aminoacides les plus différents les uns des autres. Mais il eut peut-être été plus judicieux d'appliquer *deux règles différentes* pour regrouper les aminoacides dans les groupes. La première partition rassemblerait entre eux des aminoacides divers, et dans cette partition tous les groupes se ressembleraient. Tandis que la deuxième partition rassemblerait entre eux les acides aminés homologues, et dans cette deuxième partition, les groupes seraient très différents les uns des autres. D'un côté, la deuxième partition permet de dégager un pharmacophore consensus et possède un fort rapport signal/bruit, mais elle est sujette au problème du cumul des activités. De l'autre, la première permet de choisir finement entre les différents représentants d'un groupe, et diminue le risque de cumul des activités. Mais dans cette partition, le choix d'un sous-bibliothèque peut d'avérer difficile, du fait d'un faible rapport signal/ bruit.

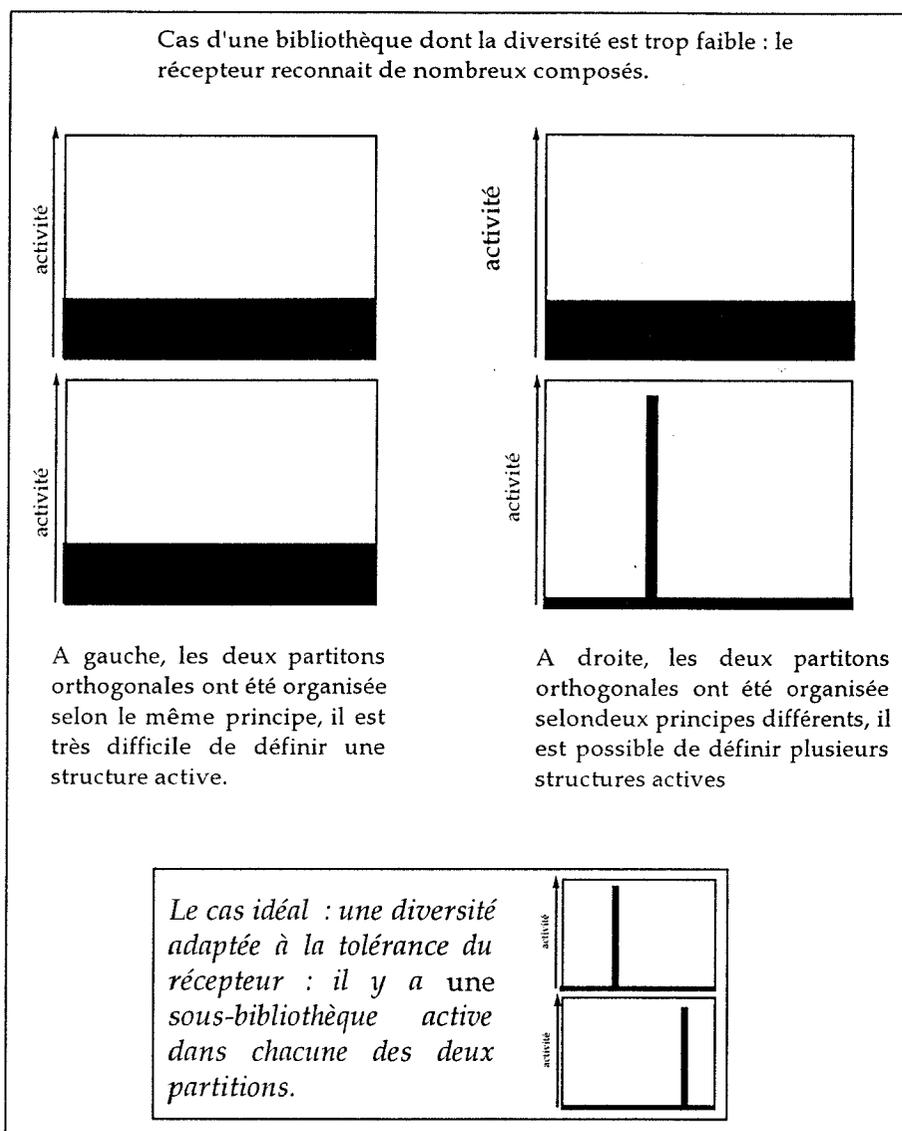


Figure 20.

Quoiqu'il en soit, définir une architecture idéale et universelle de bibliothèque, convenant à tous les tests, relève de l'utopie, tant la diversité des modes de reconnaissance des récepteurs biologiques est grande. Cette diversité est reflétée aussi bien par la diversité des structures des différents ligands choisis par la nature, que par l'étendue de la gamme des affinités de ces différents ligands pour leur récepteur, qui s'étendent du micromolaire au subnanomolaire (biotine - avidine, certains ligands artificiels du récepteur à la mélatonine)

II-3- CONCLUSION

A. PROBLEMATIQUE DES TESTS *IN VITRO*.

Pendant que les chimistes réalisaient leurs synthèses, les pharmacologues, eux, ont mis au point le test V2 sur des cellules humaines.

Le produit issu de la bibliothèque combinatoire, ainsi que les nombreux analogues synthétisés ont été testés sur ces cellules humaines. Pas une de ces molécules ne s'est avérée active sur le récepteur humain! Partant d'activités nanomolaires sur le récepteur porcin, nous espérions retrouver des activités honorables sur le récepteur humain, qui possède 85% d'homologie de séquence primaire avec le récepteur porcin.

Ceci pose un des problèmes les plus importants des méthodes de découverte de nouveaux médicaments par le criblage *in vitro*.

A-1- Choix de la cible :

La cible peut être humaine ou animale, ou même une cible humaine dans un contexte animal (cellules ou animaux transgéniques).

A-2- Choix du test :

Le test peut consister à simplement mettre en évidence une liaison entre les molécules et le récepteur (dans ce cas agonistes et antagonistes ne sont pas discriminables). Il peut également s'agir d'un test fonctionnel (détection d'un second messenger, activation d'un "reporter-gene").

Dans ce dernier cas le récepteur est nécessairement présenté dans un contexte cellulaire.

Dans certains cas (ceux où la vitesse et le coût du test ne sont pas des éléments importants) on peut tester l'activité des molécules sur des organes isolés ou même sur des animaux entiers.

La volonté d'automatiser et d'accélérer le criblage a imposé un réductionnisme (emploi de récepteurs solubles ou solubilisés, extrait de leur contexte naturel, environnement physico-chimique et métabolique) qui est à l'origine de nombreux faux positifs et négatifs. Mais l'accélération du criblage a pu compenser ces « pertes ». Il faut garder à l'esprit que le but

n'est pas de repérer toutes les têtes de séries potentiellement présentes dans les échantillothèques chimiques, mais d'en trouver quelques-unes, le plus vite possible et de pouvoir les développer le plus vite possible, tout en diminuant les risques d'échecs pendant les phases de développements précliniques et cliniques.

Dans cette optique, l'accélération extraordinaire des tests de criblage *in vitro* permet aujourd'hui de réaliser ce que l'on appelle un « profil pharmacologique » sur une soixantaine de cibles pertinentes au rythme record d'une centaine par jour! Les résultats de cette étude permettent de choisir, parmi des candidats au développement, ceux qui présenteront la meilleure sélectivité, et donc les meilleures chances de succès lors des étapes d'évaluations précliniques et cliniques.

Une double tendance s'observe actuellement pour limiter les échecs durant le développement qui suit le criblage. Il s'agit d'une part de mettre en œuvre dans les tests *in vitro*, des cibles de séquence humaine, pour s'affranchir des problèmes de spécificité d'espèce, et d'autre part d'utiliser ces cibles moléculaires dans un contexte le plus proche du contexte pathologique, c'est-à-dire dans des cellules où l'on pourra mesurer directement les effets de l'interaction ligand - cible.

Un effort important est consenti au développement de nouvelles technologies permettant de mettre en évidence rapidement et de manière sensible l'interaction ligand - cible et la cascade d'événements pharmacologiques qui peut en découler et dont le rôle physiopathologique a été démontré (à l'aide par exemple de gènes - reporteurs ou de la mesure de seconds messagers).

En conclusion, notre méthode des copies orthogonales apparaît comme une méthode de synthèse combinatoire très générale, qui permet d'inscrire des bibliothèques combinatoires de taille moyenne (environ 10,000 molécules) dans les programmes classiques de criblage pharmacologique conçus pour l'utilisation de molécules individuelles, caractérisées et

solubles. Elle est applicable à la synthèse en phase solide ou homogène, de molécules peptidiques ou non, linéaires ou cycliques. Sa redondance est optimisée et son architecture permet de diminuer le nombre de faux positifs. La modélisation des techniques de déconvolution qui s'apparentent à notre méthodes (positionnal scanning et déconvolution itérative) a été réalisée. Nous allons pouvoir, dans un avenir proche, comparer de façon théorique leur efficacité à celle de notre méthode, et ceci en fonction du type de ligand considéré et des conditions du test.

B- PERSPECTIVE :

Depuis la synthèse et l'évaluation biologique de cette bibliothèque de tripeptides non naturels, nous avons construit d'autres types de bibliothèques combinatoires, de natures non peptidiques. En dépit des efforts très importants développés pour maîtriser parfaitement les techniques d'assemblages utilisés, il s'est avéré plusieurs fois que l'entité active était le produit d'une réaction secondaire non attendue. Dans plusieurs de ces cas, l'identification de la structure active a posé de sérieux problèmes d'analyse structurale. D'une part les structures étaient complexes, mais d'autre part, paradoxalement, leur forte activité les avaient rendues détectables à très faible concentration, ce qui rend l'exercice d'élucidation structurale d'autant plus difficile.

Par ailleurs, il est reconnu que le fait de tester des mélanges (combinatoires ou non) est à l'origine de faux positifs et de faux négatifs. On estime la part de composés actifs détectables quand ils sont testés seuls et non détectés quand ils sont dans un mélange de 10 composés est évalué à 20%³⁸.

Dans ces circonstances, et étant donné le besoin toujours croissant de l'industrie pharmaceutique d'une diversité moléculaire facilement exploitable, nous avons décidé la conception et la mise en place d'un automate de synthèse chimique, capable de synthétiser des produits de manière individuelle et contrôlée, et à haut débit. L'on s'affranchit ainsi des

problèmes d'élucidation structurale. D'autre part, par conception, notre automate fournit des produits individuels facilement identifiables et de manière reproductible, mais en plus ces produits sont présentés en format à haute densité, dit « 96 puits », parfaitement adapté aux procédés automatisés de « criblage » biologique. De nouvelles voies de synthèses chimiques ont été conçues, validées et sont actuellement mises en œuvres sur notre automate.

Les bibliothèques non peptidiques.

Les nouvelles voies de recherche chimique en matière de synthèse combinatoire sont axées sur l'obtention de composés non peptidiques, de poids moléculaire inférieur à 1000, dont les structures incluent des éléments classiques de pharmacophore, notamment les hétérocycles aromatiques.

Dans cette optique les chimistes organiciens développent de nouveaux procédés adaptés à la synthèse combinatoire³⁹ : des voies classiques de synthèse organique sont adaptées à la phase solide telles que les réactions de Heck⁴⁰, de Mitsunobu⁴¹, de Fischer⁴²... De réactifs supportés sont mis au point (aldéhydes ou halogénures supportés sur polystyrène pour piéger des sous-produits⁴³).

De même, de nouveaux polymères sont conçu pour faciliter l'automatisation de ces synthèses (notamment les polystyrènes greffés par des polyoxyéthylènes glycols).

Au laboratoire, nous avons développé des méthodes chimiques d'assemblage à la fois en phase homogène et en phase solide (Hydroxybenzotriazole supporté sur polystyrène pour faciliter la robotisation des réactions d'acylation), ainsi que les outils permettant de mettre ces procédés en œuvre dans une installation entièrement automatisée.

Des logiciels originaux ont été écrits pour aider au choix des matières premières utilisées dans l'assemblage de nos bibliothèques. Ces logiciels font appels à des descriptions originales des structures chimiques, à des routines de consultations automatiques de catalogues de structures, de reconnaissance de fonction chimiques, d'évaluation de la réactivité. Ils sont aussi capables

de réaliser virtuellement des réactions chimiques, de traiter de grand nombres de composés, et d'évaluer ainsi l'apport en diversité des nouvelles bibliothèques. Ils vont nous permettre d'optimiser la taille de ces bibliothèques ainsi que leur diversité.

Orthogonal Combinatorial Chemical Libraries

Benoît Déprez, Xavier Williard, Line Bourel, Hervé Coste, François Hyafil, and André Tartar*

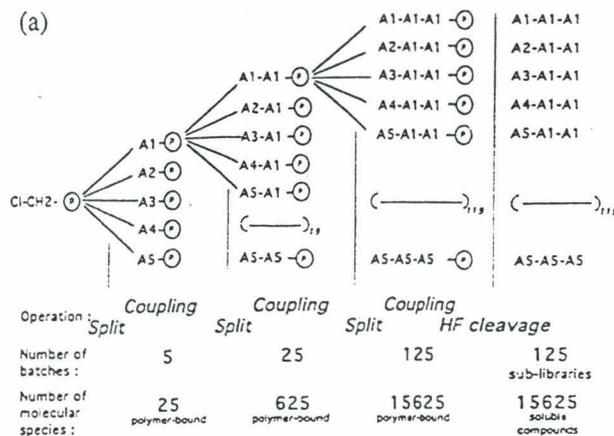
Department of Chemistry, Institut Pasteur de Lille
 Rue Calmette, 59045 Lille, France
 GLAXO Centre de recherches
 Avenue du Québec, 91951 Les Ulis, France

Received November 2, 1994

Although knowledge-based *de novo* design of high-affinity ligands for receptors or enzymes appears to be the most rational approach to the discovery of new pharmacologically active substances, high-throughput random screening of compounds having no known structural similarity with the natural ligand has proved to be a highly efficient method. To increase the input of new molecules, methods of combinatorial synthesis have been considerably developed in recent years.¹⁻⁴ Much work has been devoted to the development of various strategies designed for the identification of the active compounds in a mixture.⁵ These strategies often reduce the scope of the chemical combinations and the biological assays. To circumvent these difficulties, we have developed a general concept which we name "orthogonal libraries". Herein we describe the design, synthesis, and first use of a pair of such orthogonal libraries,⁶ leading to the discovery of a nanomolar ligand to the V2 vasopressin receptor.

Using a classical solid phase procedure, we prepared two libraries⁷ of the same soluble 15 625 trimers resulting from the combination of 25 synthons at each position, linked by two amide bonds (Figure 1a). The synthons were 23 D-amino acids and 2 nonchiral amino acids, glycine and isonipecotic acid (Figure 1b). Each library was partitioned into 125 sublibraries of 125 trimers. For the first library (A), the 25 synthons were partitioned in five groups, A₁–A₅. Each sublibrary resulted from the incorporation of one group, A_n (n = 1–5), at each of the three variable positions of the synthesis (5³ = 125). For the second library (B), the same 25 synthons were used, yielding the same 15 625 trimers. They were, however, partitioned *orthogonally* in five different groups, B₁–B₅ (Figure 1b).

The important property of the couple of libraries A and B is that, for any given n and n', A_n and B_{n'} share only one synthon. Thus, any sublibrary from A and any sublibrary from B share only one trimer. In a given screen, an active trimer will confer



	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
B 1	D-Leucine	D-Proline	D-Serine	(4-nitro)-D-phenylalanine	D-Iso-glutamic acid
B 2	D-Arginine	D-Isoleucine	Glycine	D-Threonine	D-Iso-glutamine
B 3	D-Glutamine	D-Tyrosine	D-Valine	D-ε-Nicotinoyl-lysine	D-Histidine
B 4	D-Tryptophane	D-Asparagine	D-Glutamic acid	D-Methionine sulfoxide	D-Alanine
B 5	Isonipecotic acid	D-Lysine	D-Tetrahydro-isoquinoleic acid (D-Tic)	D-Aspartic acid	D-Phenylalanine

Figure 1. Synthesis of the two libraries. (a) The two libraries were synthesized by solid phase synthesis.⁷ (b) The 25 amino acids were partitioned into five groups of five amino acids, each named A₁–A₅ for library A and B₁–B₅ for library B. In each group, amino acids were selected to maximize the structural diversity. For the synthesis of library A, each group (A₁–A₅) was coupled to a chloromethylated Merrifield resin (Cl-CH₂-), and the five mixtures of aminoacyl resins were split into five parts. To each part, one different group of amino acids were coupled. The resulting 25 dipeptidylresins were split again into five parts each and coupled with the mixtures of amino acids, leading, after deprotection and cleavage from the resin, to 125 sublibraries in a soluble form. Library B was prepared according to the same procedure, except that the orthogonal groups of amino acids, B₁–B₅, were used in this case.

activity to one single sublibrary of A and one single sublibrary of B. This active trimer can be unequivocally identified as the unique trimer shared between these sublibraries. The distribution of the 25 synthons in the groups A_n or B_{n'} has been made in such a way that the structural diversity within a group of synthons is as large as possible. This avoids the synthesis of sublibraries containing structurally related compounds which could generate cumulative biological activities. Typically, a group consisted of one hydrophilic, one aromatic, one charged, and one small-chain α-amino acid in addition to a nonnatural side chain amino acid. Thus, each sublibrary of A or B explores a wide structural space, and if one trimer confers an activity to its sublibrary, the 124 other trimers of this sublibrary are less likely to interfere with the biological assays. This structural diversity within the mixtures submitted to the screening procedure, together with the limited number of chemical entities present in each sample (125), allows a low background and an easy detection of biological activity.

According to our strategy, library A was screened initially in a series of assays. When a positive result was obtained in

(1) Houghten, R. A.; *et al. Nature* 1991, 54, 84–86.
 (2) Lam, K. S.; *et al. Nature* 1991, 354, 82–84.
 (3) Gallop, M. A.; *et al. J. Med. Chem.* 1994, 37, 1235–1251.
 (4) Gordon, M. E.; *et al. J. Med. Chem.* 1994, 37, 1335–1401.
 (5) Janda, K. D.; *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 10779–10785.

(6) A related concept, named "indexed libraries" has recently been reported for the deconvolution of a mixture of 54 carbamates: Pirrung, M. C.; *et al. J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 1240–1245. Smith, P. W.; *et al. BioMed Chem. Lett.* 1994, 4, 2821–2824. This group describes a similar strategy for the screening of 1600 esters or amides.

(7) Boc-protected amino acids were esterified to a chloromethylated resin. Benzyl-based protections were used for the side chains of trifunctional amino acids. 1-Hydroxybenzotriazolyltetramethylisouronium hexafluorophosphate (HBTU) was used for the couplings of Boc-protected amino acids mixtures. To avoid the preferential incorporation of amino acids having the most favorable coupling rates, a first coupling was performed with only 1.1 equiv of acylating species for 1 equiv of amino groups available on the resin. A second coupling step was then performed to force the reaction to completion. Amino acid analysis of 10 sublibraries showed that most amino acids were within 10% of the mean value, the most divergent ratios being within 25% of this value. At the end of the synthesis, the 250 polymer-bound sublibraries were treated for 1.5 h at 0 °C with anhydrous hydrogen fluoride in the presence of *p*-cresol and *p*-thiocresol. The resulting mixtures of peptides were precipitated with a mixture of diethyl ether and pentane, dissolved in trifluoroacetic acid, reprecipitated, and lyophilized from acetic acid. (a) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 2149–2154. (b) Tam, J. P.; Merrifield, R. B. *The peptides*; Academic Press: New York, 1987; pp 185–249.

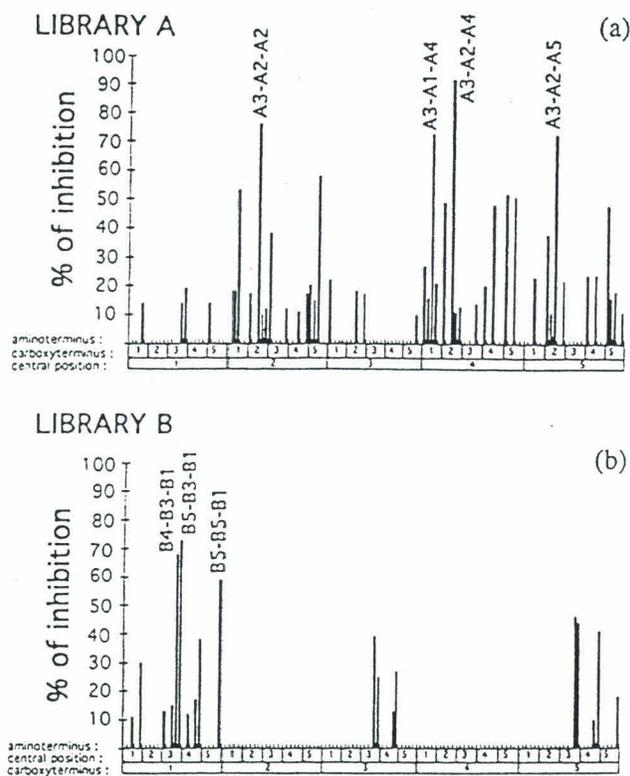


Figure 2. Biological activity of the two libraries in the V2 receptor binding assay. Cells were incubated in the presence of sublibraries from library A (a) or library B (b) at 25 $\mu\text{g/mL}$. Each bar represents the percentage of inhibition observed for one sublibrary.

one assay, library B was screened under the same conditions. In addition to allowing a direct identification of the active compound, this approach provides an internal control, as this compound is associated with a different set of 124 trimers in library A and in library B. As an example, we report the discovery of a new ligand for the V2 vasopressin receptor. All sublibraries of library A were tested at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$, corresponding roughly to 0.2 $\mu\text{g/mL}$ of each individual compound. Activities were determined by the inhibition of binding of radiolabeled vasopressin to renal LLCPK1 cells⁸ (Figure 2a). The most active sublibrary was A₃-A₂-A₄, with 92% inhibition; three other sublibraries gave inhibitions higher than 70%: A₃-A₂-A₂, 76%; A₃-A₁-A₄, 73%; and A₃-A₂-A₅, 73%, indicating that some replacements could be tolerated in the middle and carboxy-terminus positions, while in the amino-terminus position, A₃ contains a more stringent synthon. When the orthogonal library B was tested (Figure 2b), three sublibraries exhibited high activities, the most potent being B₄-B₃-B₁ with 73% inhibition, B₅-B₃-B₁ with 69%, and B₅-B₅-B₁ with 59%. This selection yielded 12 (4 × 3) possible inhibitors. To narrow the choice, we selected sublibraries on the basis of the dose-dependence of the inhibition and the potency at lower concentration. At 7.5 $\mu\text{g/mL}$, while only A₃-A₂-A₄ remained active in A (31% inhibition), in B, two sublibraries, B₅-B₃-B₁ (37%)

(8) Porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells (American Type Culture Collection) were incubated with 3 nM [³H]AVP in the presence of inhibitors. Following incubation at 4 °C for 180 min, the cells were filtered and washed. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Lutz, W.; Londowski, J. M.; Sanders, M.; Salisbury, J.; Kumar, R. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 1109–1115.

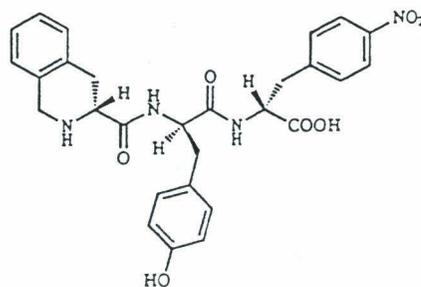


Figure 3. Structure of the trimer common to A₃-A₂-A₄ and B₅-B₃-B₁, H-D-Tic-D-Tyr-(4-nitro)-D-Phe-OH.

and B₄-B₃-B₁ (31%) remained active. The trimer common to A₃-A₂-A₄ and B₅-B₃-B₁, H-D-Tic-D-Tyr-(4-nitro)-D-Phe-OH (Figure 3), was synthesized and turned out to be a potent inhibitor (IC₅₀ = 63 nM) of vasopressin binding to LLCPK1 cells. No inhibition of binding could be detected with the candidate common to A₃-A₂-A₄ and B₄-B₃-B₁, H-D-Glu-D-Tyr-(4-nitro)-D-Phe-OH. It is thus possible that activity in the sublibrary B₄-B₃-B₁ resides in an unwanted byproduct when the reactions are performed in pools. The unambiguous identification of D-Tic as a necessary pharmacophore for V2 antagonism is further substantiated by a classical approach¹ to the identification of the active species in A₃-A₂-A₄: among the five mixtures of 25 trimers where ambiguity at the first position has been resolved, only D-Tic-A₂-A₄ (and not D-Glu-A₂-A₄) was active.

In summary, the use of orthogonal self-deciphering libraries offers several advantages: it allows the screening of compounds in their soluble form, it is not limited to polypeptides or other sequencable polymers, and it does not introduce any restriction to the chemical strategies used to generate the diversity. It can even be used for the rapid screening of existing libraries of individual compounds which can be organized as orthogonal mixtures. The interest of this approach increases with the number of screens to which the libraries are submitted, as once the libraries are prepared, no further step of deconvolution or analysis is required.⁹ Moreover, orthogonal libraries also offer an internal validation, as any positive result detected in one library must be confirmed by a positive result in the orthogonal library, thus allowing the detection of false positive results.

Acknowledgment. We thank M. G. Néliat (CEREP, Poitiers, France) for performing the binding assays and Ms. Florence Loriolle for technical assistance. B.D. and X.W. are supported by a Region Nord-Pas-de-Calais grant.

JA943561X

(9) Although also based on partitioning the library into sublibraries, orthogonal libraries differ from the positional scanning described by R. Houghten (Pinilla, C.; *et al. Biotechniques* 1992, 13, 901–905) in several aspects. A positional scan in this case would have required the synthesis of 75 sublibraries (OXX, XOX, and XXO) instead of 250. However, each sublibrary consists of 25 × 25 = 625 compounds instead of 5 × 5 × 5 = 125, introducing a 5-fold dilution factor (although in each case, the libraries contain 15 625 different compounds, in the positional scanning, each compound is synthesized three times). Moreover, the 625 compounds share the same defined position, introducing the risk that among the different possibilities, the determination of the most active sublibrary will favor the defined residue (O) which is compatible with the greatest number of combinations in the two variable positions (X) and not the residue belonging to the most active molecular entity. This risk is greatly diminished with orthogonal libraries, which are organized to maximize the diversity within each sublibrary. Moreover, each compound is tested in the presence of two different sets of 124 compounds in libraries A and B.

III- PRINCIPE DES BIBLIOTHEQUES CONVERGENTES ET DE LEUR UTILISATION COMME IMMUNOGENES.

III-1 Introduction :

L'extraordinaire variabilité du génome du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) représente l'un des défis les plus difficiles pour la conception d'un vaccin efficace. Cette variabilité du génome se traduit tout particulièrement dans les régions du protéome qui sont soumises à une importante pression sélective de la part de l'environnement.

Cette variabilité qui trouve son origine dans la mauvaise fidélité de la transcriptase inverse du virus n'est limitée que par la viabilité des individus qui en résultent. La nature des pressions sélectives à l'origine de ces mutations est de différents ordres : elle peut résulter de causes naturelles, comme c'est le cas en particulier de la réponse immunitaire du sujet infecté, mais elle peut également résulter de la pression de l'arsenal thérapeutique mis en place. Il s'agit dans ce cas des mutations susceptibles de conférer la résistance aux inhibiteurs de la protéase ou de la transcriptase inverse utilisés pour lutter contre le virus.

L'une des régions du génome viral dans laquelle on observe la plus grande variabilité d'un isolat à l'autre est sans conteste une petite partie de la glycoprotéine d'enveloppe désignée sous le nom de boucle V3. Cette région, située entre deux cystéines reliées entre elles par un pont disulfure compte de 32 à 35 acides aminés. Elle constitue la cible principale des anticorps neutralisants auquel le virus pourra échapper par des mutations dans cette région. Le potentiel de variabilité tout à fait remarquable du VIH se traduit par le fait qu'il est fréquent d'observer d'un isolat à l'autre des différences pouvant porter sur plus de la moitié des acides aminés au niveau de la boucle V3. On comprend donc aisément pourquoi il est rare que des anticorps susceptibles de neutraliser un isolat donné soient également neutralisants pour un

autre isolat. Chez un même individu, la variabilité du virus lui permet d'échapper rapidement à une réponse initiale neutralisante.

Dès le début des années 90, la vaccination contre le VIH, en ce qui concernait la composante humorale, relevait d'un paradoxe :

- d'une part, on connaissait parfaitement la région qu'il convenait de cibler pour générer une réponse neutralisante. La taille de cette région se prêtait parfaitement à un approche de type peptidique et des stratégies très efficaces avaient été élaborées pour augmenter considérablement l'immunogénicité des peptides correspondants. On citera ici en particulier celle des MAP élaborée par le groupe de Tam qui avait pu induire une réponse neutralisante durable au moyen d'un octamère de la boucle V3 branché sur un arbre de lysines⁴⁴.

- par contre, sa variabilité intrinsèque semblait la mettre hors d'atteinte de toute stratégie basée sur un immunogène défini. Ceci était parfaitement illustré dans un article publié par le groupe de LaRosa⁴⁵ par l'alignement de 138 séquences de boucles V3. Des tentatives avaient été faites en immunisant avec des mélanges de peptides reproduisant les séquences de la boucle V3 de 21 isolats différents⁴⁶. Même dans ces conditions, les réponses obtenues montraient des spécificité relativement étroites faisant craindre que des mutations ponctuelles du virus lui permettent d'échapper à leur effet neutralisant. D'autre part, l'utilisation de tels mélanges pouvait avoir pour conséquence que certaines séquences se montrent immunodominantes et biaisent la réponse contre le mélange au profit d'un nombre beaucoup plus restreint de ses composants.

III-2 Le concept de Mixotope

**A-CONCEPTION ET ACTIVITE D'UN MELANGE COMBINATOIRE
DESTINE A ELARGIR LA REPONSE HUMORALE SPECIFIQUE : LE MIXOTOPE.**

Confrontés à une telle variabilité de l'épitope neutralisant, une solution idéale consistait à induire une réponse immune non pas contre un ensemble nécessairement limité de peptides individuels mais contre un continuum antigénique représentant non seulement la variabilité existante du virus mais également sa capacité de mutation future. Idéalement, cet immunogène permettrait de recruter simultanément une large part du répertoire susceptible de reconnaître aussi bien les isolats connus mais également leur mutants possibles.

Nous avons imaginé faire appel ici également au principe de la synthèse combinatoire et à sa capacité de générer très rapidement un grand nombre d'entités différentes. Si le point de départ est commun au travail décrit dans le chapitre précédent, le but est ici totalement différent. Le principe des bibliothèques orthogonales consistait à générer et à tester en mélange des entités chimiques différentes avec pour objectif, si l'un de ces mélanges s'avérait actif, d'identifier le composant responsable de cette activité. Pour des raisons que nous avons développées, la divergence de ces bibliothèques devait être la plus grande possible. Dans le cas du mixotope, le but n'est plus d'identifier un composant actif au sein des mélanges, mais au contraire que les composants du mélange soient suffisamment proches structuralement les uns des autres pour qu'ils contribuent tous à un degré plus ou moins important à l'activité du mélange. On voit ici apparaître une exigence de convergence pour les bibliothèques constituant les mixotopes.

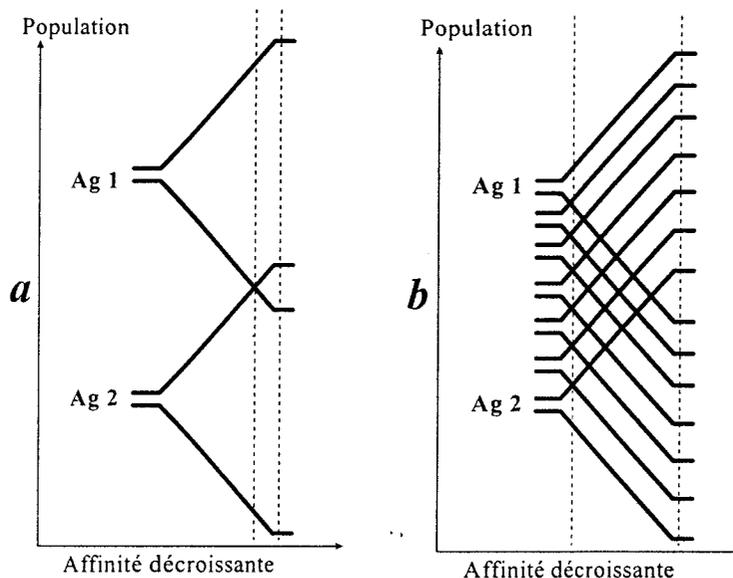


Figure 31, principe du continuum

Le schéma de la figure 31 tente de donner une image simplifiée de ce principe : en (a) est illustré le cas classique d'une immunisation au moyen de deux peptides de structures différentes. Chacun de ces peptides est susceptible d'être reconnu par une population d'anticorps qui sera d'autant plus nombreuse que le seuil d'affinité que nous fixerons sera plus bas. Le fait qu'il existe une reconnaissance croisée entre ces deux peptides dépendra donc à la fois de leur diversité structurale et de ce seuil d'affinité. Suivant ce que l'on en attend, ce seuil d'affinité peut être extrêmement variable. Dans le cas qui nous préoccupe, ce seuil se définira par l'affinité minimum requise pour qu'un anticorps puisse manifester son activité neutralisante. Si ce seuil se place au delà du point d'intersection des deux « cônes de reconnaissance », il n'y aura pas de neutralisation croisée. Par contre, si comme en (b), on établit un continuum de peptides de structure voisine entre les deux peptides extrêmes, il devient imaginable de recruter suffisamment de populations d'anticorps de spécificité voisine pour ne pas sortir du domaine de neutralisation croisée.

Si l'on tient compte du fait qu'un tel raisonnement devrait se faire dans un espace multidimensionnel, ne serait ce que par le nombre de séquences de V3 possibles, on conçoit que le nombre de peptides nécessaires à l'établissement de ce continuum est extrêmement

élevé et très certainement inaccessible au simple mélange de peptides préparés individuellement. Par contre, comme on l'a vu, la chimie combinatoire est particulièrement bien adaptée à la préparation directe et en une seule synthèse de mélanges de grands nombres de composés de structure voisine.

Nous avons donc cherché à préparer de manière rationnelle une bibliothèque convergente de peptides apparentés aux différentes séquences de la boucle V3 qui étaient connues à l'époque.

B- CONCEPTION ET SYNTHÈSE DU MIXOTOPE

B-1- Conception du mixotope V3

Pour définir ce premier mixotope, nous avons utilisé un ensemble de 138 séquences qui avaient été obtenues par amplification génique de la partie centrale de la boucle V3 à partir d'isolats de VIH sélectionnés au hasard.

Un examen individuel de ces séquences nous a permis de déterminer qu'il n'existait pas un nombre important de mutations corrélées dans des positions éloignées les unes des autres. La principale contrainte sur les possibilités de mutation semble être sa capacité à respecter l'organisation secondaire locale de la boucle. Cette notion est en effet importante car le principe même de la synthèse combinatoire est de faire disparaître toute connectivité entre les différentes positions dans le mélange final. Si une telle connectivité existait, par exemple si la présence d'un acide aminé particulier en position i impliquait celle obligatoire d'un autre acide aminé en position $i+n$, alors toutes les autres combinaisons mettant en jeu ces acides aminés n'auraient pas lieu d'être et provoqueraient une dilution « stérile » du mélange.

Seule la double insertion Gln-Arg en position centrale de la boucle correspondait à cette définition. Par chance, s'agissant de deux positions contiguës, il nous a été possible d'en respecter la connectivité : préalablement à l'incorporation de ces deux acides aminés, la résine a été divisée en deux lots de taille égale, sur l'un de ces lots, Gln puis Arg ont été couplés puis les deux lots ont été mélangés à nouveau.

A partir des séquences ainsi alignées, nous avons calculé, pour chaque position dégénérée la fréquence d'apparition des différents aminoacides. Nous avons alors fixé un seuil arbitraire de 7% au dessus duquel les acides aminés étaient incorporés en mélange. Nous avons ainsi abouti au mixotope représenté à la figure 32. D'une longueur comprise entre 22 et 25 résidus, comportant 12 positions dégénérées et deux insertions, il est constitué de près de 750.000 peptides différents.

B-2- Synthèse du mixotope V3

La synthèse a été réalisée en phase solide à partir d'une résine sur laquelle avait été préalablement fixée une cystéine. De cette manière, l'ensemble des peptides composant la mixotope V3 comportait une cystéine en position C-terminale, ce qui permettait de les greffer sur une protéine porteuse avant immunisation. Une stratégie classique de type Boc/Bzl a été employée. La seule particularité de cette synthèse résidant au niveau des couplages. En effet, dans la mesure où il est possible de s'en débarrasser par simple filtration, il est de règle en synthèse peptidique en phase solide d'employer de gros excès d'acides aminés activés. Dans le cas où ceux ci sont utilisés en mélange lors du couplage, l'utilisation de tels excès risquait de se traduire par une incorporation préférentielle des acides aminés bénéficiant des cinétiques de couplage les plus rapides. Ce phénomène a été démontré expérimentalement depuis par l'équipe de R. Houghten⁴⁷. L'une des possibilités, que nous avons employé dans le travail suivant était de faire appel à la méthode dite de « DCR » pour Divide, Couple and Recombine, selon laquelle la résine est divisée en autant de lots que d'acides aminés à coupler à cette position. Chaque couplage est alors réalisé dans un récipient séparé avec un seul acide aminé qui peut donc être utilisé en excès. Après ce couplage, l'ensemble des résines est remélangé. Au cours de ce premier travail, nous avons opté pour une approche différente : à chaque étape combinatoire, nous avons utilisé un mélange en quantités égales des différents

acides aminés. Lors du premier couplage, seul un équivalent de ce mélange par rapport au nombre de fonctions amine disponibles sur la résine est mis en jeu. Un temps de couplage prolongé est utilisé de manière à permettre même aux acides aminés les moins réactifs de s'incorporer. Ce n'est que lors du recouplage qu'un excès d'agents acylants est mis en jeu. Si une différence doit intervenir, elle ne se traduira qu'au niveau des quelques fonctions qui étaient restées libres après la première étape et donc ne pas avoir d'effet majeur sur la composition du mélange final.

Une analyse d'acide aminés réalisée sur le mixotope a permis de confirmer que les acides aminés s'étaient bien incorporés de manière satisfaisante. Comme le montrent les résultats du tableau 8, la composition déterminée expérimentale ne diffère jamais de plus de 20% de la composition théorique attendue. On pouvait donc en déduire que d'une manière générale l'ensemble des peptides prédits étaient présents dans des proportions sensiblement identiques au sein du mélange final.

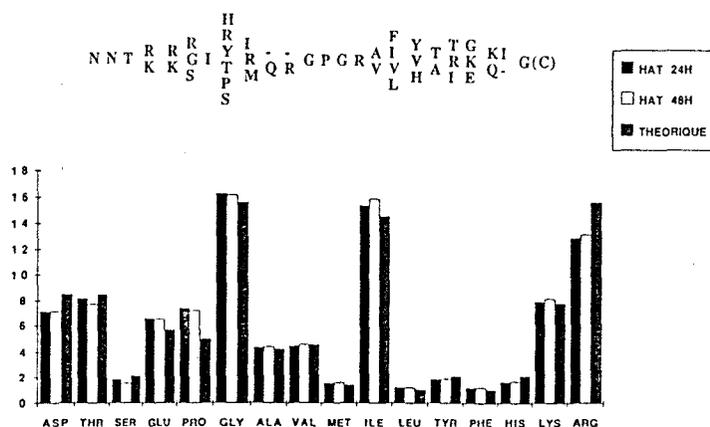


Tableau 8. Analyses d'acides aminés.

Une autre préoccupation que nous avions était de ne pas « perdre » une partie des peptides, lors de tentatives de purification. Pour cela, après clivage de la résine, le mélange a été débarrassé des sous produits de coupure par une succession de dissolution dans l'acide trifluoroacétique et de réprécipitation par l'éther éthylique.

C- RESULTATS BIOLOGIQUES :

Le mixotope ainsi obtenu a été utilisé pour immuniser des lapins. Pour cela, il a été injecté soit libre, soit couplé à une protéine porteuse, l'anatoxine tétanique au moyen d'un réactif hétérobifonctionnel. La détermination des quantités injectées s'est faite sur la base du raisonnement suivant :

Les quantités injectées (1 mg de mixotope par injection), rapportées en termes de peptides individuels (en moyenne 1,3 ng de chaque peptide) ne permettaient pas d'espérer une réponse significative si chaque peptide était pris en compte individuellement par le système immunitaire. Pour reprendre la terminologie que nous avons introduite, si le système immunitaire considérait le mixotope comme un mélange combinatoire divergent.

Par contre, dès l'instant où, pour une cible donnée du système immunitaire, un nombre suffisamment élevé de peptides voisins peuvent interagir, cet effet cumulatif permettait d'atteindre une concentration telle qu'une réponse soit possible. Nous avons calculé (figure 32) pour un peptide donné le pourcentage de peptides au sein du mixotope qui en diffèrent par 1,2,3... positions.

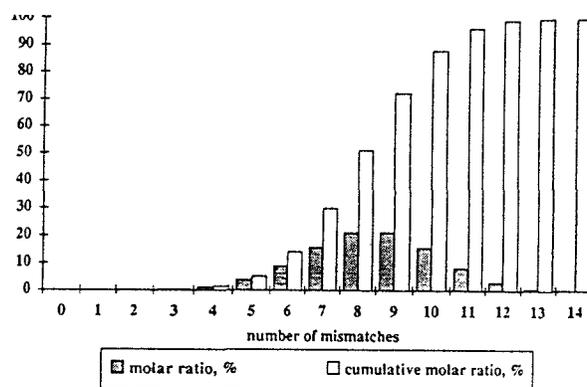


Figure 32. Divergence statistique entre deux peptides pris dans le mixotope.

On constate par exemple que plus de 10% des peptides n'en diffèrent que par 6 positions ou moins sur 24. Dans la majorité des cas, de telles différences n'interdisent pas une réactivité croisée, la quantité de peptide "ressentie" par le système immunitaire ne sera plus de 1,3 ng mais de 0,1mg, ce qui sera tout à fait suffisant pour générer une réponse. Il est intéressant de constater que cette additivité ne joue que pour les séquences retenues pour la définition du Mixotope et non pour une séquence étrangère, évitant par la même le risque de générer une réponse non spécifique contre des antigènes du soi immunologique par exemple.

C- 1 - le mixotope est un puissant immunogène :

Comme il est possible de le constater sur la figure 33, une intense réponse humorale contre le mixotope lui-même a été observée en Elisa dès la troisième semaine après l'injection. On constate également que cette réponse ne nécessite pas que le mixotope soit couplé à une protéine porteuse. Des études ultérieures entreprises dans l'équipe de Claude Auriault ont montré que le mixotope induisait une réponse T très large, ce qui rend parfaitement compte de cette observation.

```
BRU  N N T R K S I R I Q R G P G R A F V T I G K I G
MN   Y N K R K R I H I - - G P G R A F Y T T K N I I
SF2  N N T R K S I Y I - - G P G R A F H T T G R I I
RF   N N T R K S I T K - - G P G R V I Y A T G Q I I
ELI  Q N T R Q R T P I - - G L G Q S L Y T T R S R S
```

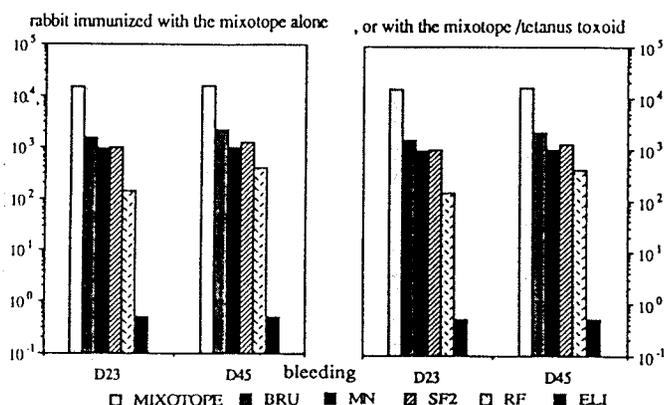


Figure 33.

C-2- Les anticorps dirigés contre le mixotope sont capable de reconnaître des peptides individuels :

Une série de 5 peptides individuels représentant des variants courants de la boucle V3 ont été préparés et utilisés comme antigènes dans les tests Elisa. Comme on peut le constater sur la figure 33, les anticorps anti-mixotope se montrent capables de reconnaître avec un titre élevé 4 des 5 peptides : BRU, dont la séquence figure intégralement dans le mixotope, mais également MN, RF et SF2 dont certains acides aminés en positions variables ne figurent pas dans le mixotope. Seul le peptide ELI, très différent de la sélection du mixotope n'est pas reconnu, ce qui, compte tenu du nombre de différences peut être considéré comme une confirmation de la spécificité de la réponse.

C- 4- Spécificité :

Les anticorps dirigés contre le mixotope reconnaissent spécifiquement la boucle V3 au sein de la gp120 comme le montre un immunoblot réalisé au moyen de cette protéine. Le test représenté à la figure 34 montre cette reconnaissance dans le cas de la gp120 de l'isolat HTLV-IIIIB qui comporte la séquence BRU.

C- 5- Reconnaissance de la protéine native :

Les anticorps ont également montré leur capacité à reconnaître la boucle V3 à la surface de cellules infectées, comme le montre la photographie en Immunofluorescence Indirecte de la figure 35.

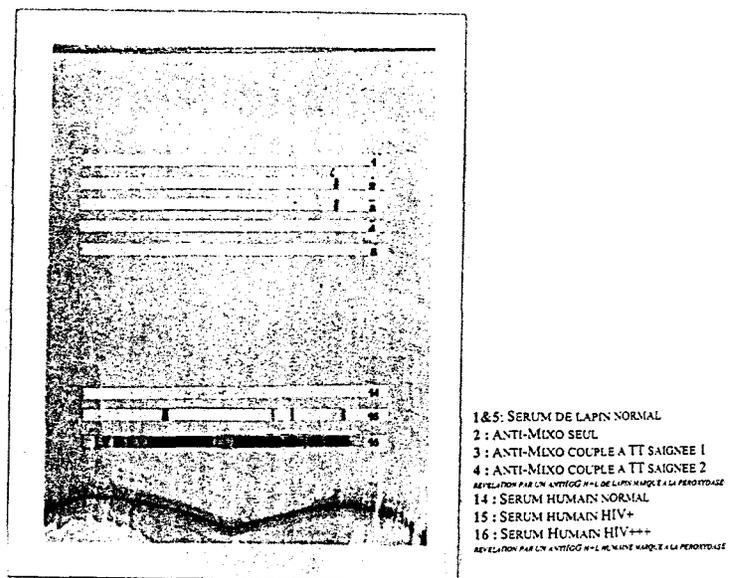


Figure 34. Immunoblot.

Peptide Research

Synthetic Vaccines and HIV-1 Hypervariability: A "Mixotope" Approach

H. Gras-Masse, J-C. Ameisen, C. Boutillon, F. Rouaix, M. Bossus, B. Deprez, J-L. Neyrinck, A. Capron and A. Tartar
Pasteur Institute, Lille, France

INTRODUCTION

Vaccine development based on the use of individual recombinant proteins or peptides has been impeded by the high degree of amino acid variability, related to the selective pressure of the immune system, within immune functional epitopes, such as neutralizing epitopes. An example is the principal epitope (3,12), which is capable of eliciting neutralizing antibodies against HIV-1. This epitope, located in the third hypervariable domain (V3) of the major surface glycoprotein, gp120, consists of 32–35 amino acids located between two invariant cysteines linked by a disulfide bridge. In this region, differences as high as 50% can be found between HIV-1 isolates. Thus, recombinant proteins and peptides derived from different isolates have been shown to induce mostly HIV-1 subtype-specific neutralizing antibodies. Previous studies have shown the possibility of inducing broadly reactive antibodies, by injecting a mixture of peptides derived from the V3 loops of 21 distinct HIV isolates (10), or a hybrid peptide designed from two different isolates (2). A limit to these approaches is that only antibodies with relatively limited specificities are elicited; and even though some cross-reactivities may be expected, point mutations giving rise to variants escaping neutralization are still likely to occur under the selective pressure of the immune system.

In an attempt to circumvent this problem, we have synthesized a mixed V3 loop peptide, which we propose to name "mixotope," containing around 7.5×10^5 different combinatory peptides. The aim of our approach was to simultaneously recruit the broadest part of the immune repertoire capable of recognizing not only the known isolates, but also the highest possible number of escaping mutants.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis

The synthesis followed the stepwise strategy using the BOC-TFA scheme (7,8), using an Applied Biosystems Model 430A peptide synthesizer (Foster City, CA), on a t-BOC-pMeBzl-Cys PAM resin (Applied Biosystems) (9) (1 mmol; loading of the starting resin: 0.72 mmol/g). Accurately weighted equimolecular amounts of appropriate protected amino acids were used in coupling reactions when degenerate sites were required. Side chain protecting groups were: Glu(OBzl), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Arg(Tos), Tyr(BrZ), Cys(4-MeBzl), Met(O), and His(Bom). All protected amino acids were from Propeptide (Vert-le-Petit, France). The first coupling was performed with 1 mmol total amount of the introduced activated BOC-amino acid. A second coupling, using 2 mmol total amount, was then systematically performed. The activation procedure was the dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole (DCC/HOBt) method for all couplings, except when coupling on Gln residues, with a long (90 min) coupling reaction period. The solvent was *N*-methyl pyrrolidinone (NMP) during the first 30 min; dimethylsulfoxide (DMSO) was introduced in the reactor for the last 60 min, and one equivalent diisopropylethylamine (DIEA) was added after 45 min. When coupling on glutamine residues, we performed a short coupling time (30 min), with addition of DMSO after 20 min, but without addition of DIEA, followed by a second 35-min coupling with 2 mmol, with addition of DMSO after 20 min and DIEA after 30 min. After each cycle, the completeness of the coupling reaction was tested by a quantitative ninhydrin assay. A third coupling was then performed with

ABSTRACT

The hypervariability of the gp120 envelope protein principal neutralizing domain, the V3 loop, represents a major problem in the design of vaccines against HIV-1. We have designed a mixed V3 loop peptide, termed "mixotope," obtained in a unique synthesis, and containing around 7.5×10^5 different sequences of 22 to 25 residues, organized around the conserved GPGR tetrapeptide. Free or coupled to a carrier protein, the "mixotope" induced in rabbits broadly specific antibodies, which recognized different individual V3 loop sequences, and the native gp120 protein. The "mixotope" approach may allow researchers to focus vaccine strategy against hypervariable functional epitopes of various pathogens.

standard protocol when necessary. The program was adapted to optimize vortex mixing during the introduction of solvents and reagents (all solvent and reagents for peptide synthesis were from Aldrich, Strasbourg, France). After assembly of the complete protected peptide chain, the t-BOC group was removed with 50% trifluoroacetic acid (TFA). The resin was dried, cleaved and deprotected in a Teflon-Kel F-HF apparatus (ASTI, Courbevoie, France), in a low concentration of HF (13) in dimethylsulfide in the presence of *p*-cresol and *p*-thiocresol (25:65:7.5:5) for 2 h at 0°C, followed by a high-HF procedure in HF, *p*-cresol and thiocresol (90:7.5:2.5) for 1 h at 0°C. The crude peptide was purified by three consecutive TFA/diethylether precipitation steps.

Acid Hydrolysis and Amino Acid Analysis

Hydrolysis of the peptide was with HCl 6 N, phenol 1% at 110°C for 24 h, and 48 h in evacuated, sealed tubes. Amino acids were quantitated on a Beckman amino acid analyzer Model 7300 (Beckman Instruments, Fullerton, CA) with post column ninhydrin detection.

Conjugation with Tetanus Toxoid

Tetanus toxoid (15 mg, kindly provided by Institut Mérieux, Lyon, France) was dissolved in 5 ml dimethylformamide (DMF):100 mM phosphate buffer, pH 7.2, (25:75). The heterobifunctional agent 6-maleimidocaproic acid (Fluka, Mulhouse, France) (11.25 μmol, 2.37 mg) was activated separately using BOP reagent (Richefeu Biotechnologies, St. Hyacinthe, QC, Canada) (11.25 μmol, 5 mg) and DIEA (33.75 μmol, 6 μl) in 1 ml DMF, at 0°C, for 10 min, before addition to the tetanus toxoid solution. The mixture was then stirred at room temperature for 24 h, and then exhaustively dialyzed against 100 mM phosphate buffer, pH 7.2.

The cystine residue of the mixotope (31 mg, ca. 11.25 μmol), dissolved in water, was reduced using tributylphosphine (11.25 μmol, 27 μl of a 10% solution in propanol) for 30 min at room temperature, and immediately introduced to the maleimidated tetanus toxoid. The mixture was again stirred

Table 1. Alignment of the Five Individual V3 sequences Used in the Immuno-enzymatic Assay

BRU	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	Q	R	G	P	G	R	A	F	V	T	I	G	K	I	.	G	N	M	R	Q	A	H	C
MN	T	R	P	N	Y	N	K	R	K	R	I	H	I	.	.	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	K	N	I	I	G	T	I	R	Q	A	H	C
RF	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	T	K	.	.	G	P	G	R	V	I	Y	A	T	G	O	I	I	G	D	I	R	K	A	H	C
SF2	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	Y	I	.	.	G	P	G	R	A	F	H	T	T	G	R	I	I	G	D	I	R	K	A	H	C
ELI	A	R	P	Y	Q	N	T	R	Q	R	T	P	I	.	.	G	L	G	Q	S	L	Y	T	T	R	S	R	S	I	I	G	.	Q	A	H	C

Residues in bold character are not represented in the mixotope.

at room temperature for 24 h, and then exhaustively dialyzed against 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, 0.15 M NaCl. Quantification of the conjugate was by amino acid determination after total acid hydrolysis of an aliquot of the solution, and was adjusted to 1 mg/ml.

Rabbit Hyperimmunization Procedure

Rabbits (female, New Zealand) were first immunized by subcutaneous injection (at one site, under the omentum) of free or protein-conjugated peptide (1 mg of peptide in 1.5 ml of phosphate buffer, or 1 ml of the conjugate solution) in Complete Freund Adjuvant (CFA) (1:1) on day 0. They were boosted at the same site with the same dose of free or protein-conjugated peptide in Incomplete Freund Adjuvant (IFA) on day 14. Rabbits were then boosted with free peptide (1 mg) in IFA, on day 28. On days 23 and 45, blood was collected immediately before the first injection.

Immuno-enzymatic Assay

Ninety-six-well plates (Maxisorb, Nunc, Denmark) were incubated overnight at room temperature with 200 μl of a 10 μg/ml solution of the peptide antigen in a 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, and blocked afterwards with 300 μl of a 1% casein (Merck, Darmstadt, Germany) solution in 1.8% NaCl/0.01 M phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) for 1 h at room temperature. After washing (1.8% NaCl/0.01 M PBS, pH 7.2/0.1% Tween-20), 200 μl of 2-fold dilutions of sera in 1% casein (Serva)/1.8% NaCl/0.01 M PBS, pH 7.2, were put into duplicate wells and incubated 2 h at 37°C. The presence of antibodies was revealed after multiple washings by adding 200 μl of 1/10 000 goat-antirabbit IgG (H+L) coupled to horse-

radish peroxidase (Diagnostic Pasteur, Marnes La Coquette, France). After incubation (2 h at 37°C) and washings, a substrate solution (citrate buffer/H₂O₂/ortho phenylenediamine [OPD]) was added. After a 30-min incubation, protected from light at room temperature, the reaction was stopped using 100 μl H₂SO₄ 4 N. Absorbance was recorded at 492 nm using a microplate reader (Dynatech Labs, Chantilly, VA). The background was estimated from the negative control (day 0, samples from the same rabbits diluted 1/100), and was less than 0.01 absorbance unit (AU).

ELISA titers of sera obtained in rabbits immunized with the "mixotope," either conjugated or not conjugated to a carrier, were determined on the "mixotope" itself, or on individual V3 sequences. A rabbit antitetanus toxoid serum was used as a negative control. Titers are expressed as the inverse of the dilution giving a 1-AU signal.

Western Blot Analysis

The commercial test kit for detection of seroreactivity to HIV (Du Pont HTLV-III Western Blot IgG; DuPont de Nemours, Les Ulis, France) was used according to the assay procedure described by the manufacturer. The antigens in rabbit sera were detected using goat anti-rabbit IgG (H and L chain) antibodies, coupled to horseradish peroxidase (Diagnostic Pasteur). 4-Chloro-1-naphthol in methanol/PBS solution/H₂O₂ was used as an enzyme substrate in the antigen detection step (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Immunofluorescence Analysis

Uninfected and infected U937 cells, fixed on slides in mixed acetone-alcohol (50:50, vol:vol), were treated with 1/100 dilution of rabbit antibodies, and the slides were incubated at 37°C for 30 min in humid atmosphere. After

washing in PBS for 10 min, a fluorescent anti-mouse antibody directed towards rabbit IgG (H+L) (Pasteur Diagnostic), diluted in Evans blue, was added. After 30 min, cells were washed to remove unbound fluorescent antibodies and then mounted in glycerol. Slides were examined using a Leitz Dialux 22 fluorescence microscope (Leitz, Wetzlar, Germany) with 40 \times objective. Photomicrographs were taken with a Leica MPS 12 camera (Leica, Heerbrugg, Switzerland) using a Kodak Ektachrome p800/1600 film. Sequences of the unrelated peptides were: EKKKGPKDVTVKVYFDLRIGDEDVC, CGKIEVEKPFALAKE.

RESULTS AND DISCUSSION

The "mixotope" was synthesized using solid-phase peptide synthesis, by simultaneously coupling the most probable amino acids in each degenerate position (Figure 1). The selection of these most probable amino acids was based on the values initially determined by Putney et al. (11), who had amplified by PCR and sequenced the central region of V3 from 138 randomly selected isolates. Considering that large deletions inside V3 do not seem to be tolerated, and that simultaneous mutations in different positions do not seem to be highly correlated, we have considered that the statistical occurrence of the different amino acids observed in each degenerate position may reflect the selective constraint for the maintenance of a spatial folding of the V3 loop, and was thus representative of a large part of the amino acids likely to occur in these positions during mutations. In each degenerate position, we arbitrarily selected all amino acids having a percent occurrence higher than 7% according to the data published by Putney et al. (11). An additional cysteine residue was introduced in the C-terminal position, in order to allow coupling to a carrier protein through a heterobifunctional agent (6).

The only possible analytical control of the final product was its amino acid composition. Equimolar amounts of appropriate protected amino acids were used in the coupling reaction when degenerate sites were required. For the same reason, "gaps" were obtained by removing half of the peptide resin, during incorporation of Ile in position 23,

and during incorporation of the dipeptide Gln-Arg in position 10-11. During coupling that involves more than one residue, the use of large excesses of activated amino acids is likely to include preferential incorporation of those amino acids having the most favored coupling kinetics. In order to avoid

this, one possibility is to split the peptidyl resin and to perform each coupling with a single amino acid in a separate vessel, and then to pool the resins (4). In our hands, this method proved to be time-consuming and to lead to severe losses of product during resin splitting. We preferred to use an

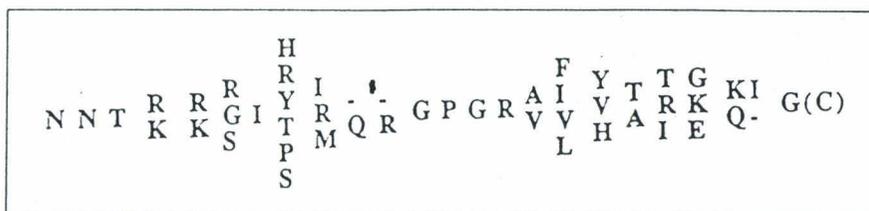


Figure 1. Composition of the "mixotope" construction. Single-letter amino acid code is used. Intentional deletions during the synthesis, corresponding to gaps in the sequence's alignment, are represented by the symbol "-". In each of the degenerate positions, the different amino acids (or the gap) were represented in an equivalent fraction (e.g., 1/3 for each amino acid in positions where 3 possibilities were considered, 1/6 where 6 possibilities were considered).

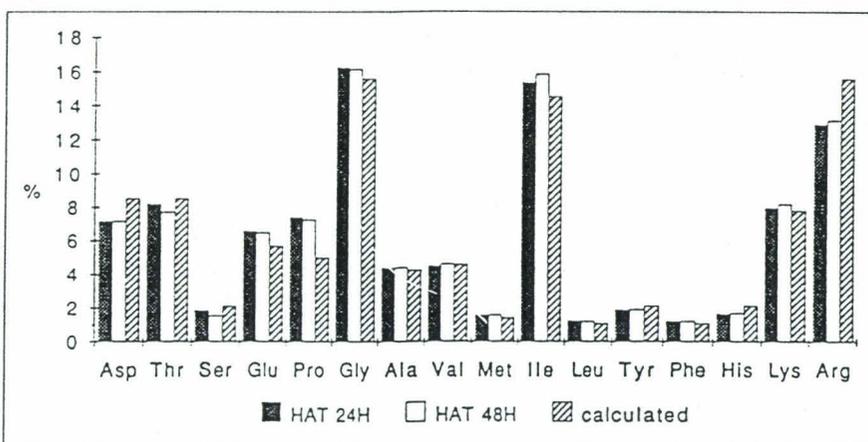


Figure 2. Amino acid composition determined after 24 and 48 h of acid hydrolysis, compared with the theoretical composition, calculated on the basis of an equimolar amount of each amino acid introduced in the degenerated positions.

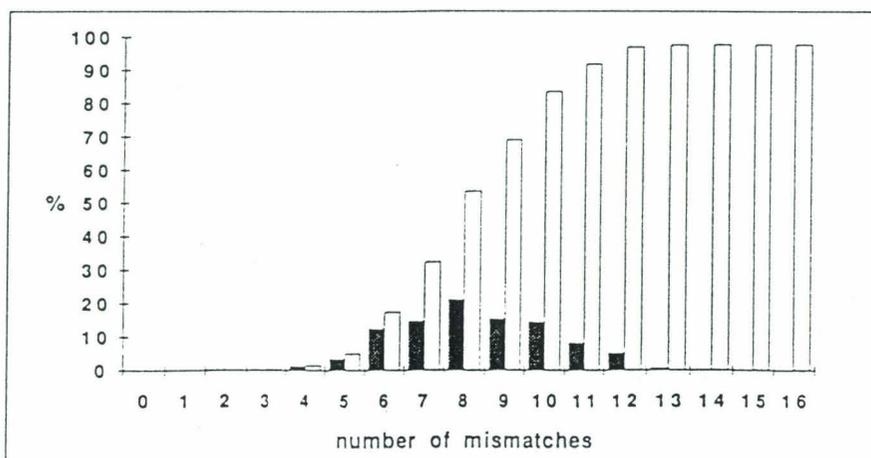


Figure 3. Distribution of the "mixotope" sequences. Considering a statistical Poisson distribution of the 7×10^5 individual sequences contained in the "mixotope," we have calculated the percent occurrence of sequences containing 1, 2, 3, ... etc. "errors" (or "mismatches") relative to any given individual sequence contained in the mixture (grey bars). Cumulative molar ratios, corresponding to the percent occurrence of sequences containing less than 1, 2, 3, ... etc. "mismatches," were also calculated (white bars).

automated synthesis protocol in which, during initial couplings, only one equivalent of the amino acid mixture was used for one equivalent of amino group available on the peptidyl resin. The DCC/HOBt activation procedure was carried out for 90 min, as it is usually associated with a long coupling time. After each cycle, the completeness of the coupling reaction was tested with a quantitative ninhydrin assay. This strategy allowed an efficient incorporation of even the slowest coupling species in the mixture. In order to avoid pyroglutamic acid formation, a shorter coupling time was used when coupling on Gln residues. During the recoupling steps, an excess of amino acid mixture was used. Thus, if any differential incorporation occurred at this level, it would only involve the few remaining free amino groups and have little effect on the overall composition of the mixotope. After deprotection and cleavage of the peptide, using the "low-high HF" protocol, the crude peptide was purified from the scavengers and the other ether-soluble by-products by three consecutive TFA/diethylether precipitation steps. This method was selected because, in contrast to conventional chromatographic methods available, it is not likely to introduce a bias in the composition of the resulting mixture. The amino acid composition, determined after total acid hydrolysis of an aliquot of the "mixotope," was in good agreement with the value calculated from the theoretical composition, indicating that no significant preferen-

tial coupling had occurred (Figure 2).

Statistical analysis (Figure 3) of our "mixotope" showed that 53% of the combinatory peptides had 8 mismatches or less with reference to any given individual sequence contained in the mixture, i.e., 17 correct residues out of the 25 positions, corresponding to more than 68% homology.

Our hypothesis was that any given individual antibody, instead of being specific for a single amino acid sequence, may exhibit a much broader recognition pattern, being able to tolerate variations in some positions. For each individual component of the immune system, such a mixture of 750 000 closely related molecular species would therefore be considered as a less complex mixture, taking into account particular recognition pattern and cross-reactivity. Moreover, when used as immunizing antigen, the "mixotope" may favor, to some extent, the degeneracy of the immune response, enlarging the diversity of antibody produced towards recognition of interrelated peptides, corresponding to most "possible" mutated sequences of the neutralizing domain.

Antisera were raised in rabbits to the "mixotope," alone or conjugated to a carrier protein (tetanus toxoid). The sera were tested by ELISA (Figure 4) on plates coated with the "mixotope" itself. During the same experiment, titers were also determined against five different V3 peptides: BRU, whose sequence fits with one of the combinatory sequences present in the mixotope;

MN, RF, and SF₂, which possess amino acids not represented in some of the degenerated positions; and ELI, corresponding to the most divergent sequence. In the sera obtained against the "mixotope," free or coupled to tetanus toxoid, antibody titers to the "mixotope" itself were up to 1/15 000. The level of antibodies to the individual peptides was lower by only one order of magnitude against BRU, MN, SF₂, and two orders of magnitude against RF. The specificity of the recognition was confirmed by the absence of reaction observed when testing the most divergent V3 peptide (sequence ELI), and two peptides unrelated to the V3 sequence (not shown). This result shows that the "mixotope" induced a broadly cross-reactive, although specific, antibody response against several V3 peptides. Further studies will be required to define more precisely the correlation between this cross-reactivity and amino acid divergence within the individual sequences.

In order to investigate whether antibodies generated following

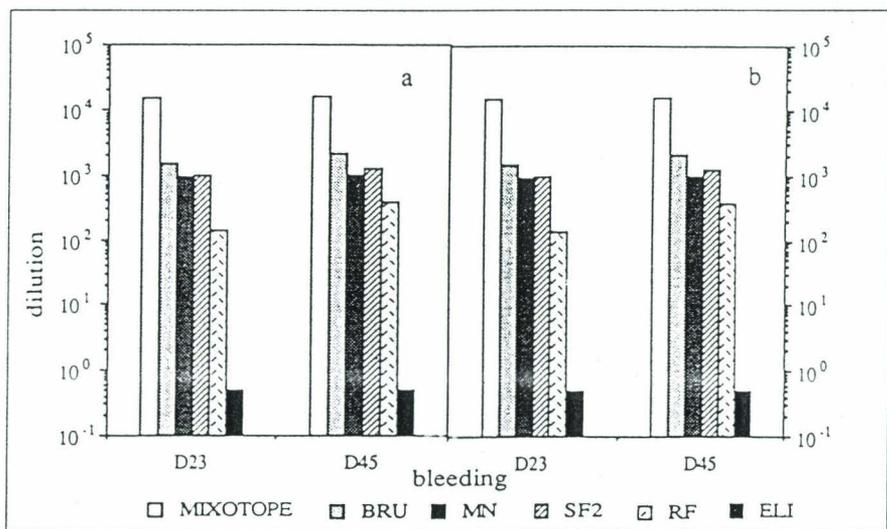


Figure 4. Reactivity of the "mixotope" antisera, tested in ELISA against different individual V3 sequences. a: Serum titer of rabbit immunized with the "mixotope" alone; b: serum titer of rabbit immunized with the "mixotope" conjugated to tetanus toxoid.

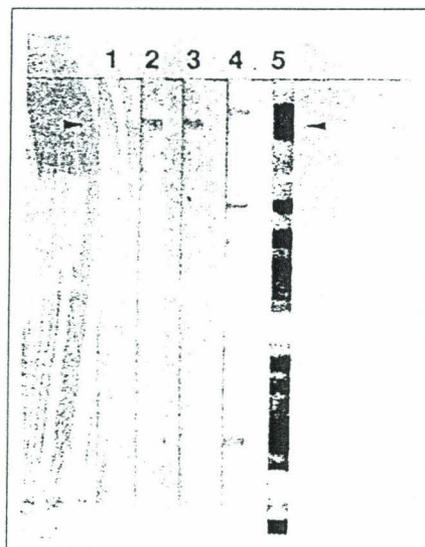


Figure 5. Specific recognition of the gp120 protein by the "mixotope" antisera. Rabbits' sera were assayed by immunoblotting towards electrophoretically separated HIV-1 proteins (HTLV-IIIB isolate); arrowheads indicate the position of the gp 120 protein. Lane 1, normal rabbit serum; lane 2, serum of a rabbit immunized with the free "mixotope"; lane 3, serum of a rabbit immunized with the "mixotope" conjugated to tetanus toxoid; lane 4, human HIV-1 + serum; lane 5, human HIV-1 +++ serum; sera used in lanes 4 and 5 are the internal positive controls provided by the manufacturer of the HTLV-IIIB Western Blot kit (Du Pont de Nemours); lane 4 serum is a twofold dilution of lane 5 serum, from an HIV seropositive patient.

"mixotope" immunization were able to recognize the native gp120 envelope protein, the antisera were evaluated by Western blots containing all native polypeptides from HIV-1 III-B isolate, separated under denaturing conditions (Figure 5). The antibodies recognized exclusively the gp120 protein.

Immunofluorescence studies performed on the human monocyte U937 cells, uninfected or infected with the HIV III-B isolate, showed that antibodies raised against the carrier-conjugated "mixotope" were able to recognize specifically the cells infected by the HIV-1 III B isolate. No immunofluorescence was observed when testing the same antiserum against uninfected U937 cells, nor when assaying control antisera raised against an unrelated peptide or tetanus toxoid. Surprisingly, antibodies raised against the free "mixotope," which showed the same ELISA titers against the "mixotope" and the individual V₃ peptides than antibodies obtained after immunization with the carrier-conjugated "mixotope," bound neither to infected nor to uninfected cells (not shown).

The fact that the "mixotope" did not need to be conjugated to a carrier to induce a strong antibody production showed that it contained T-helper epitopes. However, although the ELISA titers were comparable when immunizing with the mixotope (free or conjugated to a carrier protein), the functional characteristic, such as recognition of the native structure expressed at the surface of infected cells, was only observed with antibodies obtained in one rabbit immunized with the mixotope conjugated to tetanus toxoid. This suggests that qualitative differences in the antibody response, related to individual variations and/or coupling to a carrier protein, can be observed that could involve the isotypic distribution of the antibodies, their fine specificities inside the 25 positions along the peptide sequence, or their capacity to interact with a functional three-dimensional V₃ loop on the viral gp120. These data also imply that an HIV-1 vaccination strategy based on the use of the "mixotope" may require the use of a conjugated "mixotope." In this context, an HIV-1 protein with low variability, such as the *gag* protein, might represent an optimal carrier for the "mixotope."

Regarding the mixotope itself, we

have deliberately designed our construction according to the unfavorable hypothesis where no correlation between the observed mutations was assumed, except for the Gln-Arg insert, characteristic of the LAV-1(BRU)-type sequences. However, analysis of the V₃ loop sequences from over 200 isolates suggested the existence of discrete classes of viruses (1,5) that exhibit common sequence features. Mixotope constructions corresponding to each of these subclasses would be less degenerate, and thus much more easy to standardize in the context of vaccine development.

The potential interest of the "mixotope" approach is not limited to the V₃ loop of HIV-1 gp120, but should also allow research to focus vaccine strategies on the most variable epitopes of other pathogens, which until now had to be avoided in approaches using strictly defined immunogens.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de le Recherche Médicale, from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA.

REFERENCES

- Holley, L.H., J. Goudsmit and M. Karplus. 1991. Prediction of optimal peptide mixtures to induce broadly neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6800-6804.
- Javaherian, K., A. Langlois, G. LaRosa, A.T. Profy, D.P. Bolognesi, W. Herlihy, S.D. Putney and T.J. Matthews. 1990. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hyper-variable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* 250:1590-1593.
- Javaherian, K., A. Langlois, C. McDanal, K. Ross, L.I. Eckler, C.L. Jellis, A.T. Profy, J.R. Rusche, D.P. Bolognesi, S.D. Putney and T.J. Matthews. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6768-6772.
- Lam, K., S. Salmon, E. Hresh, V. Hruby, W. Kazmierski and R. Knapp. 1991. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 354:82-84.
- LaRosa, G., J. Davide, K. Weinhold, J. Waterbury, A. Profy, J. Lewis, A. Langlois, G. Dreesman, R. Neal, R.N. Bobswell, P. Shaddock, L. Holley, M. Karplus, D. Bolognesi, T. Matthews, E. Emini and S. Putney. 1990. Conserved sequence and struc-

tural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 249:932-935.

- Lee, A.C., J.E. Powell, G.W. Tregaer, H.D. Niall and V.C. Stevens. 1980. A method for preparing β -hCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition. *Mol. Immunol.* 17:749-756.
- Merrifield, R.B. 1963. Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154.
- Merrifield, R.B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232:341-347.
- Mitchell, A.R., B.W. Erickson, M.N. Ryabtsev, R.S. Hodges and R.B. Merrifield. 1976. tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 98:7357-7362.
- Neurath, A.R. and N. Strick. 1990. Confronting the hypervariability of an immunodominant epitope eliciting virus neutralizing antibodies from the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Mol. Immunol.* 27:539-549.
- Putney, S., G. LaRosa, T. Matthews, E.A. Emini, R.N. Bobswell, D. Bolognesi and K. Weinhold. 1990. The principal neutralizing determinant of HIV-1. p. 189-193. *In* M. Girard and L. Valette (Eds.), Quatrième colloque des Cent Gardes. Pasteur Vaccins. p. 189-193.
- Rusche, J.R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D.L. Lynn, R. Grimaila, A. Langlois, R.C. Gallo, L.O. Arthur, P.J. Fishinger, S.D. Putney and T.J. Matthews. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope. gp 120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3198-3202.
- Tam, J.P., W.F. Heath and R.B. Merrifield. 1983. S_N2 deprotection of synthetic peptide with a low concentration of HF in dimethylsulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 105:6442-6445.

Address correspondence to:

Hélène Gras-Masse
Chimie des Biomolécules
Université Lille II
URA CNRS 1309
Institut Pasteur
59019, Lille Cédex, France

III-2 COMPLEXITE ET DIVERSITE DES MIXOTOPES. Y-A-T-IL UNE LIMITE A LA COMPLEXITE DES MIXOTOPES?

Vaccine , accepté

A- GENERALITE DE L'OUTIL MIXOTOPE.

Comme nous l'avons développé au chapitre précédent, une bibliothèque convergente de peptides analogues de la boucle V3 -le Mixotope V3- est susceptible d'induire une réponse humorale efficace mais de spécificité élargie. Ce résultat a été confirmé récemment par le groupe de Torrès dans le domaine du virus de l'immunodéficience du Macaque (VIS), qui est très similaire au VIH. Les anticorps qu'ils obtiennent en injectant un mélange combinatoire de 300,000 peptides de 21 aminoacides se montrent capables de reconnaître le virus avec une affinité excellente mais également des épitopes analogues. Quoique le groupe de Torrès ait omis de citer nos travaux pourtant publiés 2 ans auparavant, on peut s'étonner de la similitude entre les deux modèles : deux rétrovirus proches, des peptides de longueurs similaires, des complexités très proches ($3 \cdot 10^5$ ou $7 \cdot 10^5$ peptides). La stratégie du Mixotope est en effet d'une très grande généralité.

- A-1 généralité de modèle :

Elle s'applique à tous les cas où la sélection naturelle s'est traduite par une variabilité dans les aminoacides en plusieurs positions d'une séquence peptidique. Ceci dépasse largement le cas de l'hypervariabilité des épitopes neutralisants pour concerner les séquences dégénérées dont on retrouve des répétitions multiples dans de nombreuses protéines parasitaires. On peut également appliquer l'approche Mixotope aux mélanges de peptides retrouvés naturellement associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

Il est même envisageable d'engendrer artificiellement une variabilité pour explorer par exemple la remplaçabilité des aminoacides dans certaines positions d'un arrangement structuralement défini.

A-2- Généralité de poids moléculaire :

Hormis les limites inhérentes à la synthèse peptidique, il n'existe aucune limite dans la longueur des peptides figurant dans un Mixotope.

A-3- Généralité de complexité :

Dans le reste de ce chapitre, on appellera complexité le nombre de constituants d'un Mixotope. Ce nombre est fonction du nombre de positions dégénérées et du nombre d'acides aminés introduits en chaque position dégénérée. L'augmentation du nombre de positions dégénérées comme du nombre de variants par position se traduit par un accroissement très rapide de la complexité. Cette complexité ne doit pas être confondue avec la notion de diversité, développée ci-après.

La diversité d'un Mixotope n'est plus une grandeur mathématiquement évaluable, comme la complexité. Elle dépend des critères employés pour l'évaluer. Elle se rapproche en cela de la notion de divergence développée au chapitre précédent. Deux mixotopes de même complexité pourront selon la nature des aminoacides présents dans chaque position variable, constituer des mélanges très divers ou au contraire très semblables. Bien entendu, cette appréciation de la diversité dépendra du système de reconnaissance biologique impliqué.

D'un point de vue pratique, le développement de vaccins basé sur l'utilisation de bibliothèques combinatoires pose plusieurs problèmes. Le premier objectif du Mixotope (ou des Mixotopes) est d'élargir la spécificité d'une réponse humorale pour la rendre efficace non seulement contre l'épitope de référence mais aussi sur les épitopes de la même famille. Il était donc important de déterminer les niveaux maximaux et minimaux de complexité (plutôt que de diversité) encore capables de déclencher une réponse humorale de spécificité large. D'une part, il est nécessaire d'explorer l'immunoréactivité des Mixotopes les plus complexes. En effet le risque pour de telles bibliothèques est non seulement de perdre leur immunogénéicité, mais aussi d'induire une réponse trop faiblement spécifique. D'autre part, de manière à

assurer une reproductibilité de synthèse accrue et à faciliter le contrôle-qualité des Mixotopes par des méthodes telles que le séquençage, la spectrométrie de masse et l'analyse d'acides aminés, une préférence est donnée aux Mixotopes de faible complexité. Il est donc intéressant de connaître la complexité minimale efficace.

B- CONCEPTION ET SYNTHÈSES

Dans le travail qui va suivre, nous nous sommes attachés à évaluer quels pouvaient être les effets des variations de complexité et de diversité au sein d'une famille homogène de Mixotopes dérivés ici également d'une série de séquences de la boucle V3.

B-1 CONCEPTION DES MIXOTOPES.

Lorsque nous avons entrepris ce travail, une quantité considérable d'information concernant la boucle V3, dont nous ne disposions pas lors de la conception du premier Mixotope, avait été publiée. Il s'agissait en particulier d'une ensemble de 235 séquences publiées par LaRosa et ses collaborateurs qui couvrait alors l'ensemble de la boucle V3 de cystéine à cystéine, et non plus restreint à la partie centrale. Un élément supplémentaire était l'observation de la marginalité de l'insert Gln-Arg, spécifique des séquences BRU ("LAI"), que nous avons introduit dans le premier Mixotope V3 et que nous avons donc écarté pour la présente l'étude.

Sur cette base, nous avons défini une série de valeurs de fréquence d'apparition comme seuils au dessus desquels un aminoacide est incorporé dans le mélange utilisé dans les différentes positions variées. Par exemple, en considérant une représentation seuil de 50 sur 235, 3 positions seulement seront dégénérées (10, 11 et 22). Le Mixotope correspondant à ce seuil, noté Mixotope 50/235 comptera donc 3 positions variées à 2 variants et comptera donc

2x2x2=8 congénères. En faisant diminuer ce seuil d'introduction, on fait augmenter très rapidement la complexité des Mixotopes., puisque le Mixotope 20/235 compte déjà 3840 congénères et que le Mixotope 8/235 en compte lui 1.5 milliard !

position number	5	10	15	20	25	30	35	number of peptides
consensus	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTGTGEIIGDIRQAHC							1
mixo 50/235		R G		A				8
mixo 30/235		R G		A	D	N		72
		R			R			
mixo 20/235	S	K R G	T	I A	D	N		3840
		R R			R			
		P			K			
mixo 15/235	I S	K R G	T M	V I A	E D	T N	K	552960
		R R			K R			
		P			K			
		N			Q			
		S						
mixo 10/235	I S	K R G	T M	K V I H A	E D	T N	K Y	32.5 millions
	Y	S R	R L	V	K R		R	
			P	L	R K			
			N		Q			
			S		A			
			Y		N			
mixo 8/235	I S	K R G	T M	K V I H A R E D	V T	N	K Y	1.5 billion
	Y	S R	R L	V L A K R		R R		
			P	L	R K			
			N		Q			
			S		A			
			Y		N			
mixo 5/235	I S S	I K R G L T M	L	K V I H A R E D V T N N M	K Y			27,396 billions
	Y	V S N R	R L	N V L A K R		R R		
	G	A I Q	P V	T L F	R K	V		
			N	Y V	T Q			
			S	W	A			
			Y		D N			
			F		G			

Figure 36. Composition des Mixotopes n/235, en fonction du seuil d'incorporation n

Derrière cette augmentation astronomique de nombre de constituants des Mixotopes nous avons cherché à connaître, compte tenu de la convergence, quelles allaient être les réactions du système immunitaire face à ces différents mélanges.

B-2 SYNTHÈSES.

Comme nous l'avons indiqué au chapitre précédent, deux stratégies de préparation s'offrent au chimiste.

- la stratégie « DCR », qui permet un contrôle rigoureux des stœchiométrie mais qui implique qu'une seule espèce peptidique soit synthétisée par bille de résine. La complexité des Mixotopes préparés par la méthode « DCR » ne peut donc pas excéder la quantité de billes mises en jeu lors de la synthèse. Pour que les dernières étapes de randomisation⁴⁸ soient

statistiquement valables, il faut que le nombre d'espèces différentes présentes dans le lot à fractionner soit très inférieur à ce nombre de billes disponibles. En pratique, en vertu de la loi de Poisson, il faut environ 10 fois plus de billes que de congénères pour que 95% des congénères attendus soient effectivement présents. Typiquement, une synthèse réalisée à l'échelle de la millimole sur des billes dont la charge est d'environ 10 à 100 picomoles met en jeu 10^7 à 10^8 billes. Dans ces conditions la méthode « DCR » n'était utilisable que pour la préparation des 3 Mixotopes les moins dégénérés.

Pour les Mixotopes les plus complexes, nous avons fait appel à la méthode « en mélange », mettant un jeu une quantité stœchiométrique du mélange requis d'acides aminés pour le premier couplage, puis 2 Eq de mélange pour un deuxième couplage systématique. Cette méthode a été décrite dans le chapitre précédent. Après clivage du polymère et déprotection des chaînes latérales, les mélanges ont été débarrassés des contaminants de faible poids moléculaire par gel-filtration sur phase « Sephadex G10 ». Cette méthode chromatographique est particulièrement adaptée à la situation puisque tous les congénères engendrés lors de la synthèse combinatoire ont un poids moléculaire supérieur à la limite d'exclusion de ce gel. De plus, les deux cystéines N et C-terminales invariantes ont été soumises à une étape d'oxydation sous haute dilution (0,5 mM) pour conduire à l'établissement d'un pont disulfure intramoléculaire. Hormis le contrôle colorimétrique de la disparition des fonctions thiol, aucun contrôle de cette étape n'a été possible. Par contre, l'incorporation des acides aminés a été contrôlée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale. Les résultats regroupés dans le tableau 9 montrent que les analyses donnent des compositions très proches des compositions théoriques.

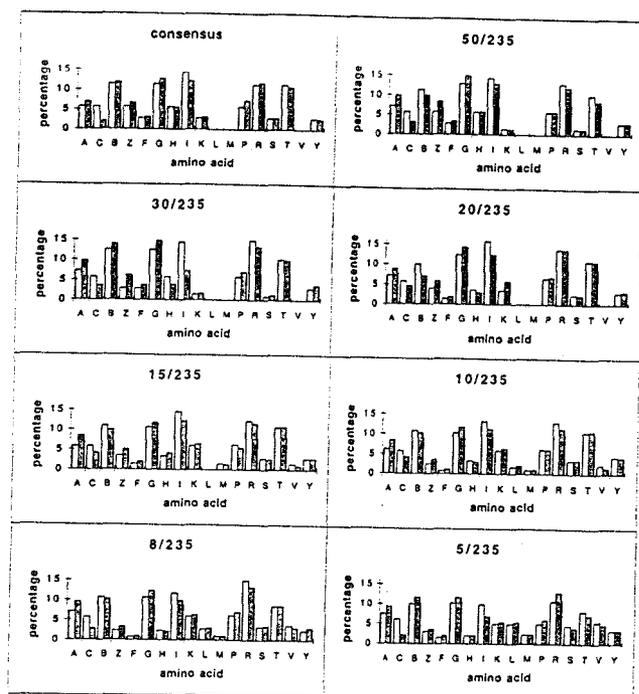


Tableau 9. Compositions expérimentales (en blanc) et théorique (en noir).

C- RESULTATS BIOLOGIQUES.

Comme nous l'avons observés lors de études précédentes, les Mixotopes non couplés à une protéine porteuse sont immunogènes. Les lapins ont donc reçu les Mixotopes sous forme libre. Une injection primaire a été réalisée en Adjuvant complet de Freund , et suivie de deux rappels effectués en adjuvant incomplet.

C-1- IMMUNOGENECITE DES MIXOTOPES.

Pour chacun des sérum obtenus contre les différents Mixotopes, nous avons d'abord déterminé la capacité à reconnaître l'immunogène parent. Ces déterminations ont été réalisée en ELISA, le Mixotope parent étant adsorbé à la surface des plaques. Nous avons ensuite comparé la reconnaissance *in vitro* des Mixotopes parents par les différents sérum, à celle du peptide consensus. On constate que, hormis le Mixotope le plus complexe (5/235), qui contient 27,000 milliards de séquences différentes, et pour lequel on obtient une réponse moyenne et surtout variable d'un lapin à l'autre, les différents mixotopes engendrent une forte réponse humorale spécifique.

C-2- ELARGISSEMENT DE LA REPONSE.

La faculté des sérum obtenus par immunisation avec les Mixotopes à reconnaître différents peptide V3, proches du Consensus comme SF2, MN ou RF, ou plus éloignés comme BRU et ELI a été évaluée par ELISA.

position number	5	10	15	20	25	30	35																													
Consensus	T	R	P	N	N	T	R	K	S	I	I	*	*	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C		
SF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	*	*	G	P	G	R	A	F	H	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	
RF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	*	*	G	P	G	R	A	F	A	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C	
MN	-	-	-	Y	K	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRU	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	Q	R	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ELI	A	-	Y	Q	-	-	Q	R	T	P	-	*	*	-	L	Q	S	-	-	-	-	-	-	-	R	S	R	S	*	I	-	G	-	-		

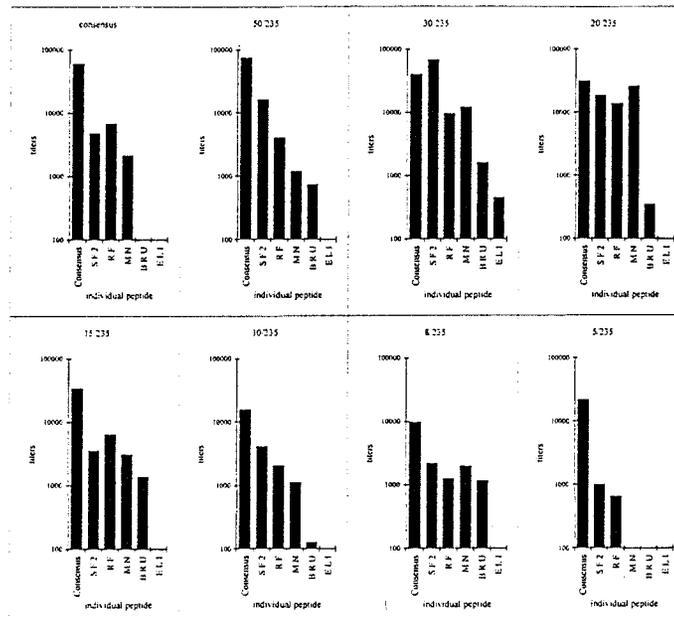


Tableau 10. Séquences de peptides V3 de référence et titres obtenus contre ces peptides avec les sérum anti-Mixotopes.

Nous avons observé que plus l'immunogène est complexe (à l'exception du 5/235), meilleure est la reconnaissance des peptide de la famille du consensus. Par contre, les peptides plus divergents sont moins bien (BRU) ou pas du tout (ELI) reconnus.

La réponse immune engendrée par les Mixotopes est donc large, mais reste spécifique d'un famille de séquences. Ceci est confirmé par le fait qu'un Mixotope correspondant à

l'internaline de *Lysteria monocytogenes*, comprenant 10^{12} peptides n'est pas mieux reconnu par les sérum anti-Mixotope V3 que l'agent de saturation.

Cette « large spécificité » peut avoir plusieurs explications. Si l'on emploie le vocabulaire créé pour les bibliothèques combinatoires pour définir une population d'anticorps, on peut dire, pour expliquer la large spécificité, que la population d'anticorps anti-mixotope est soit peu diverse et alors elle est constituée d'anticorps individuellement peu spécifiques, soit diverse et alors constituée d'un mélange de nombreux anticorps de spécificité fine.

Pour trancher entre les deux hypothèses nous avons réalisé les expériences de compétitions suivantes.

On observe que des titres comparables à ceux obtenus pour les Mixotopes sont obtenus quand on immunise avec un peptide unique. Peut-on dire pour autant qu'une fraction importante des anticorps reconnaissant le Mixotope parent est aussi capable de reconnaître le peptide en question ? (hypothèse de la population d'anticorps peu diverse) On peut tenter de répondre à cette question en réalisant des expériences de compétition en ELISA. En incubant un sérum anti-Mixotope avec différent peptides uniques notés i dans la figure 38 et confrontant ces mélanges au Mixotope parent adsorbé dans les puits de plaques ELISA (congénères notés a à z), on peut déterminer la capacité d'un peptide unique à lier les anticorps qui reconnaissent le Mixotope parent. Si la population d'anticorps d'un sérum est une juxtaposition de nombreuses « sous-populations » de forte spécificité, alors on est dans le cas illustré par le puits de gauche de la figure, et le peptide inhibiteur est peu efficace. Par contre si la population d'anticorps de sérum est une population homogène d'anticorps semblables et de spécificité large alors le peptide i, le Consensus par exemple, est bien reconnu et inhibe la fixation des anticorps au Mixotope. Ce deuxième cas est illustré par le puits de droite.

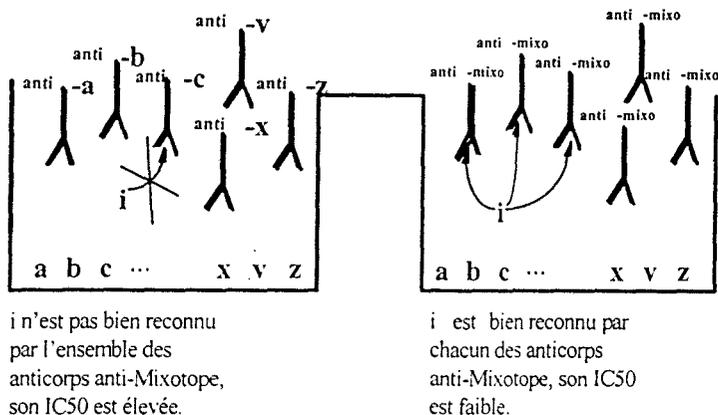


Figure 38. *A gauche hypothèse d'une population diverse d'anticorps, à droite, hypothèse d'un population peu diverse.*

Bien entendu, l'IC50 mesurée fait aussi intervenir une deuxième caractéristique, spécifique au peptide inhibiteur : son homologie structurale avec les congénères adsorbés au fond du puits et contre lesquels les sérum ont été dressés. Cette notion d'homologie sera discutée dans le paragraphe suivant.

Pour ces expériences de compétition, nous avons choisi un sérum obtenu contre un Mixotope très dégénéré, le 8/235. Nous avons observé que parmi les peptides bien reconnus en ELISA direct, seul le peptide Consensus est bon inhibiteur de la liaison des anticorps anti-Mixotope au Mixotope parent (tableau 11)

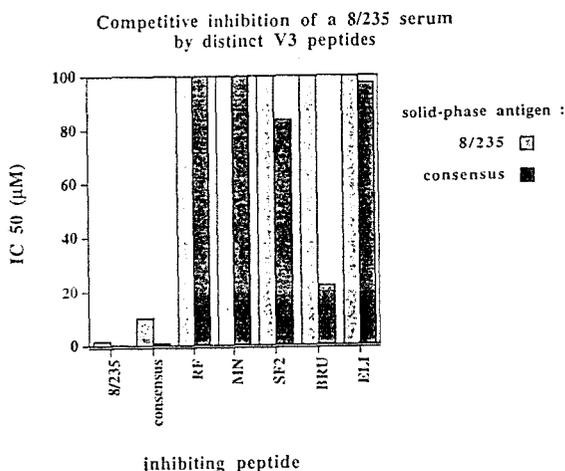


Tableau 11. IC_{50} des différents peptides dans une expérience d'inhibition de la liaison des anticorps anti-Mixotopes soit au Consensus, soit au Mixotope lui-même.

Ces données suggèrent que les deux hypothèses sur la population d'anticorps ne sont pas mutuellement exclusives. Il s'agirait en fait d'une situation intermédiaire : les sérum anti-mixotopes seraient donc constitués d'une population peu diverse d'anticorps, mais dont la faculté de reconnaissance serait fonction de la parenté structurale entre le Mixotope immunogène et l'antigène.

Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons calculé un score de similitude entre les immunogènes parents et les antigènes, pour vérifier ensuite la relation entre la reconnaissance des antigènes par les sérum en ELISA et ce degré de parenté.

Pour calculer la similitude entre les mixotopes et les séquences uniques, nous avons procédé de la manière suivante.

1/ Il a été supposé que la similitude entre deux séquence est une fonction linéaire des similitudes entre aminoacides d'une même position dans la séquence.

2/ Pour mesurer le degré de similitude entre aminoacides d'une même position, une matrice de « remplaçabilité épitopique » déterminée par Geysen⁴⁹ a été utilisée.

Pour chaque position de la séquence, la moyenne arithmétique des scores entre l'acide aminé de la séquence de l'antigène et les aminoacides de la séquence de l'immunogène a été calculée. C'est cette moyenne qui a été retenue pour évaluer la similitude position par position. Les délétions ont reçu un score arbitraire de 0.

La moyenne des similitudes par position a ensuite été utilisée comme évaluation de la similitude globale entre les séquences. NB : Peut-être les différentes positions auraient-elles du recevoir différents facteurs de pondération.

Les résultats de l'étude de corrélation entre les titres des sérum et le degré de similitude immunogène - antigène ont été les suivants.

Il existe une corrélation nette entre la similarité de structure calculée entre l'immunogène parent et l'antigène et la reconnaissance de ces antigènes par les sérum (figure 39).

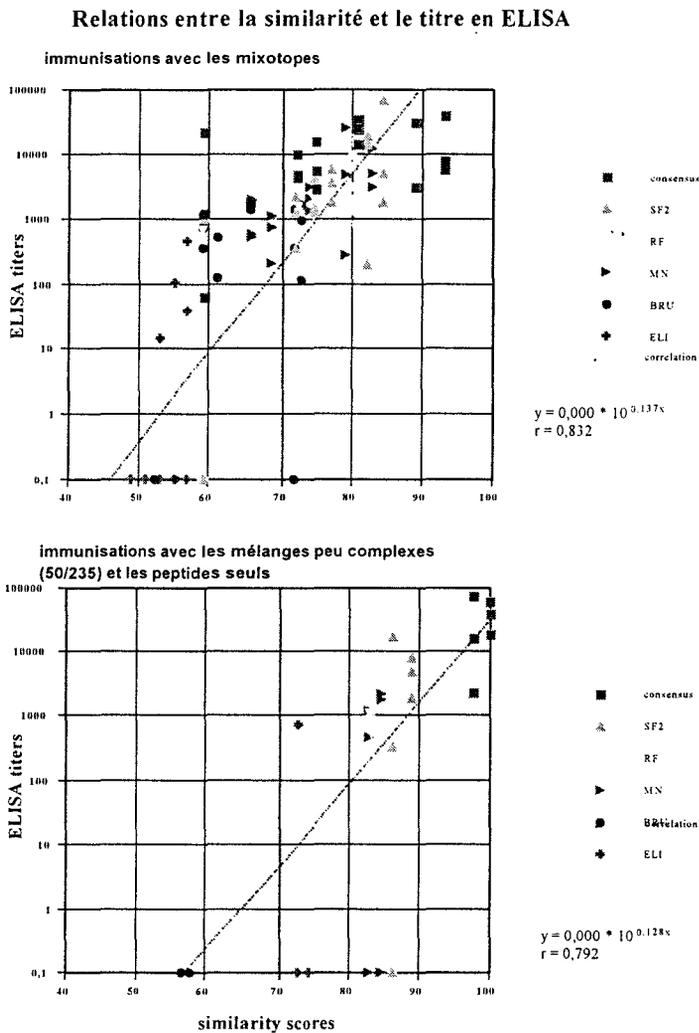


Figure 39. Corrélation Similitude //Reconnaissance.

En outre, il semble que le fait de dégénérer l'immunogène permette de mieux reconnaître des séquences moins homologues. Comme on peut le voir, les sérum obtenus contre le Mixotope 50/235 ou le Consensus reconnaissent mal les séquences plus éloignées. Pour ces sérum une similitude supérieure à 60% est nécessaire pour obtenir une reconnaissance mesurable en ELISA.

En conclusion, des mixotopes de complexité allant de 10^2 à 10^9 congénères ont provoqué des réponses globalement comparables. Toutes ces constructions sont de bons immunogènes, engendrant des réponses comparables à des peptides purs. Fait intéressant, la reconnaissance des antigènes semble être fonction de la ressemblance structurale entre l'antigène et l'immunogène, allant de l'absence de reconnaissance pour des peptides « non V3 » à une reconnaissance optimale de la séquence Consensus, en passant par une faible reconnaissance des peptides V3 de parenté éloignée comme BRU et ELI. Cette discrimination entre peptide apparentés et peptides éloignés semble s'accuser avec la diminution de la complexité du Mixotope.

D'un point de vue plus général, si l'avenir du concept de mixotope dans le domaine de la vaccination de populations humaines semble compromis, faute de moyens analytiques à la fois adaptés aux mélanges complexes et répondant aux critères exigés pour la mise sur le marché d'un médicament, cette nouvelle catégorie d'immunogènes combinatoires n'en reste pas moins un outil précieux dans de nombreux autres cas.

Dans de nombreux cas où un sérum ou des anticorps sont utilisés comme réactifs, en biologie ou en biochimie, il peut être intéressant d'utiliser un mixotope comme immunogène pour préparer ces anticorps.

Gausepohl et ses collaborateurs ont utilisé un Mixotope comme immunogène pour préparer des anticorps génériquement dirigés contre une famille de protéines. Il s'agissait de repérer simultanément sur un gel d'électrophorèse toutes protéines portant la séquence carboxyterminale KDEL⁵⁰. Le Mixotope synthétisé avait la séquence suivante : XXXXXXKDEL ou X représente 19 aminoacides naturels (seule la cystéine n'était pas représentée).

De même, on pourrait imaginer de produire des populations d'anticorps à activité catalytique de spécificité large. Il existe en effet un intérêt important en synthèse organique pour des

enzymes ou des abzymes qui auraient de faibles spécificités de substrat et par conséquent un large spectre d'utilisation. Pour produire de telles populations d'anticorps, une idée serait d'immuniser avec des Mixotopes construits en encadrant le mime de l'état de transition avec des séquences peptidiques dégénérées.

Confronting the degeneracy of convergent combinatorial immunogens, or ‘mixotopes’, with the specificity of recognition of the target sequences

H. Gras-Masse*†, C. Boutillon*, E. Diesis*, B. Deprez* and A. Tartar*

Immunization by convergent combinatorial peptide libraries, or ‘mixotopes’ represents an interesting approach for inducing broadly cross-reactive immune response to hyper-variable pathogens. The authors have immunized rabbits with a series of eight HIV-1 V3-loop derived constructs of increasing complexity, and analysed the reactivity of the corresponding antisera towards a set of V3-related peptides. Results were surprisingly homogeneous. Mixotopes containing as many as several billion closely related combinatorial sequences were immunogenic, and able to induce V3-specific antibodies. These results suggest that serological cross-reactivity depends on the sequential similarity of the antigen with the parent immunogen. Such ‘mixotopes’ could represent a useful approach to vaccination against hypervariable pathogens. © 1997 Elsevier Science Ltd.

Keywords: V3-loop peptide, convergent peptide libraries, mixotopes, serological cross-reactivity

The principal epitope capable of eliciting neutralizing HIV-1 antibodies¹ provides a typical example of the difficulties encountered in the development of vaccines based on the use of individual recombinant proteins or peptides. This epitope, located in the third hypervariable domain (V3) of the major surface glycoprotein, gp120, consists of 32–35 amino acids located between two invariant cysteines linked by a disulfide bridge. In this region, sequence differences, presumably induced by the selective pressure of the immune system, can exceed 50%. Thus, peptides derived from different isolates have been shown generally to induce HIV-1 subtype-specific neutralizing antibodies.

An ideal solution for a vaccine to an hypervariable pathogen would be to recruit simultaneously the broadest part of the repertoire susceptible of recognizing not only the known isolates, but the most probable mutants. To achieve this goal, the authors have previously proposed the use of a combinatorial construct, that collectively represents the variability of the V3 loop sequence, which the authors proposed to name ‘mixotope’². Our construct was 22–25 residues

long and contained a mixture of 7.5×10^5 closely related peptides, obtained in a single synthesis by incorporating simultaneously one to six amino acids in each of the degenerated positions. This mixotope, when free or coupled to a carrier protein, elicited in rabbits broadly specific antibodies which recognized different individual V3 sequences, and the native gp120 protein. The mixotope has also been used, without carrier, to immunize rodents^{3,4}, and induced a strong immune response in all syngeneic and outbred rodents tested. It is able to elicit a T cell and B cell repertoire of relevant specificity, that is broadly reactive to several individual V3 peptides related to the immunizing mixotope. However, this immune response remained specific, being unable to recognize a distantly V3-related sequence (ELI), or unrelated control peptides.

More recently, a similar construct, derived from an hypervariable epitope of the envelope glycoprotein of the simian immunodeficiency virus was proposed by the group of Torres⁵ to immunize macaques, with similar results. This construct was shown to induce antibodies with enhanced binding to the native SIV and broad immunoreactivity to related epitope analogues. The construct used was 21 residues long, with 15 degenerated positions in which two amino acids were coupled simultaneously, and contained 3×10^5 related peptides in a combinatorial construction.

The development of vaccines based on the use of such combinatorial constructs raises important

*Faculté de Pharmacie-URA CNRS 1309, Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, 59019 Lille, BP 245, France. †To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33 20 87 77 76; fax: 33 20 87 73 77; e-mail: helene.gras@pasteur-lille.fr. (Received 6 May 1996; revised version received 7 February 1997; accepted 28 February 1997)

Table 2 Sequences of the individual peptides. Frames indicate the amino acids that are not represented in any of the constructs in our series. - indicate residues identical to the residue found in the consensus sequence; * indicate gaps performed in the sequences alignments

position number	5					10					15					20					25					30					35							
Consensus	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	*	*	G	P	G	R	A	F	Y	T	T	G	E	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C		
SF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	*	*	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	
RF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	K	*	*	-	-	-	-	-	-	-	A	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-
MN	-	-	-	Y	-	-	K	-	-	R	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	K	N	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	
BRU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	Q	R	-	-	-	-	-	-	-	V	I	-	K	*	-	N	M	-	-	-	-	-	-	-	-	
ELI	A	-	-	Y	Q	-	-	-	Q	R	T	P	-	*	*	-	L	-	Q	S	-	-	-	R	S	R	S	*	I	-	G	-	-	-	-	-		

recombine (DCR) method, in which amino acids were manually introduced into separate vessels to synthesize the degenerated positions. The most degenerated mixotopes (15/235, 10/235, 8/235 and 5/235) were prepared by the 'mix' technique, in which the different amino acids were introduced as pre-defined mixtures at each degenerated position. This protocol was adapted to an automatic peptide synthesizer (Applied Biosystems model 430 A peptide synthesizer, Foster City, CA) as previously described². An irrelevant mixotope, 36 residues long, designed from a set of repetitive sequences of the internalin of *Listeria monocytogenes*, and containing 1.49×10^{12} sequences, was synthesized according to the same procedure (not shown).

After assembly of the complete protected mixotopes, the t-Boc groups were removed with 50% TFA, and the resins were dried, cleaved and deprotected in a Teflon-Kel F-HF apparatus (ASTI, Courbevoie, France), in a low-concentration of HF in dimethylsulfide⁶ and in the presence of *p*-cresol and *p*-thiocresol (25:65:7.5:2.5) for 2 h at 0°C. This was followed by a high-HF procedure in HF, *p*-cresol and *p*-thiocresol (90:7.5:2.5) for 1 h at 0°C. The crude mixotopes were separated from the aromatic by-products derived from scavengers by three consecutive steps of dissolution in TFA (5 ml) followed by precipitation by pouring into cooled diethylether (300 ml). Cyclization of the mixotopes was then achieved according to a protocol previously validated on several distinct V3-loop sequences^{7,8}. After centrifugation, precipitates were redissolved to 0.5×10^{-3} M in a 0.1 M ammonium acetate pH 8.6 buffered water solution and submitted to air oxidation for 48 h to allow cyclization by formation of intramolecular disulfide bridges. Solutions were concentrated in vacuo and lyophilized. Peptides were desalted by gel filtration on a Sephadex G10 column.

Peptide characterizations

Amino acid analysis. Hydrolysis of the peptides and mixotopes was performed with 6 N HCl/phenol (10/1) at 110°C for 24 h in sealed tubes under vacuum. Amino acids were quantified on a Beckman amino acid analyser model 7300 using ninhydrin detection.

Mass spectrometry. Mass spectra were recorded on a Bio Ion 20 plasma desorption mass spectrometer, Bio Ion AB, Uppsala, Sweden. Spectra were accumulated for 10^7 fission events which took ≈ 180 min. Samples (1 mg in 1 ml of water; 50 μ l) were applied to nitrocellulose-coated targets, prepared by the spin drying technique (using 50–100 μ l of a 2 mg ml⁻¹ nitrocellu-

lose solution in acetone, applied onto a 1 cm i.d. Mylar foil). Mass determination was possible only for individual peptides. Results were as follows: consensus, [M+H]⁺calc. 3941, found 3942; MN, [M+H]⁺calc. 3983, found 3984; RF, [M+H]⁺calc. 3737, found 3739; SF2, [M+H]⁺calc. 3822, found 3822; BRU, [M+H]⁺calc. 3950, found 3952; ELI, [M+H]⁺calc. 3731, found 3733.

Analytical HPLC. Ten-microliter aliquots of peptide solutions (1 mg ml⁻¹) were applied onto a Vydac C₁₈, 5 μ m, 300 Å column (250 mm x 4.6 mm) in a Shimadzu system. Solvent A was 0.05% TFA in water, solvent B was 0.042% TFA in acetonitrile–water (80/20). All individual peptides eluted as single symmetric peaks.

Rabbit hyperimmunization procedure

Rabbits (female, New Zealand) (three rabbits per immunogen) were first immunized by subcutaneous injection (at one site, under the omoplate) of free peptide or mixotope (1 mg in 1 ml of phosphate buffered saline) in complete Freund's adjuvant on day 0. The rabbits were boosted with 1 mg of the same immunogen in 1 ml of phosphate buffer, in incomplete Freund's adjuvant on days 15, 37 and 57. Blood samples were collected on days 0, 44 and 65.

Immuno-enzymatic assay

Ninety-six well plates (Nunc) were incubated overnight at room temperature with 200 μ l of a 10 μ g ml⁻¹ solution of the antigen (peptide or mixotope) in a 0.05 M sodium carbonate/sodium bicarbonate buffer pH 9.6, and blocked afterwards with 300 μ l of a 1% casein (Serva) solution in 1.8% NaCl/0.01 M phosphate buffer, pH 7.2, during 1 h at room temperature. After four washings (1.8% NaCl/0.1% Tween-20/0.01 M phosphate buffer, pH 7.2), 200 μ l of twofold dilutions of sera in 1% casein/1.8% NaCl/0.01 M phosphate buffer, pH 7.2 were put in duplicate wells and incubated for 2 h at 37°C. The presence of antibodies was revealed after four washings by adding 200 μ l of a 1/10000 solution of goat-anti rabbit IgG (H+L) coupled to horseradish peroxidase (Diagnostic Pasteur) in 1% casein/1.8% NaCl/0.01 M phosphate buffer pH 7.2. After incubation (2 h at 37°C) and four washings, 200 μ l of a substrate solution (citrate buffer/H₂O₂/OPD) were added. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the reaction was stopped using 50 μ l H₂SO₄ 4 N. Absorbance was

recorded at 492 nm using a microplate reader (Dynatech). The background was estimated from the negative controls (day 0 samples from the same rabbits, at a dilution of 1/100), and was less than 0.01 absorbance unit. Titers were expressed by calculating the inverse of the highest dilution giving a 1 absorbance unit signal.

Inhibition experiments

The selected representative serum was collected from the best responder rabbit in the group of three animals immunized with the 8/235 mixotope. The solid phase antigens (the consensus peptide or the 8/235 mixotope) were coated as described above. The dilutions selected for the serum were those giving a 1 absorbance unit signal when reacting upon the consensus peptide (1/9800) or the 8/235 mixotope (1/20800), in the absence of inhibitors. The anti-8/235 serum was then incubated with 200 μ l of fivefold dilutions of the inhibiting peptides, in 1% casein (Serva)/1.8% NaCl/0.01 M phosphate buffer pH 7.2, for 2 h at 37°C, in duplicate wells. Inhibiting peptides were the 8/235 mixotope, the consensus, RF, MN, SF2, BRU and ELI peptides. Bound antibodies were determined as above. Inhibiting capacities were expressed as the IC₅₀ (concentrations giving 50% of inhibition of the signal in the absence of inhibitor).

Similarity analysis

The biological acceptability of amino acid substitutions in epitopes has been experimentally studied by Geysen *et al.*⁹ who established a replaceability matrix for amino acids with limited replaceability in epitopes. Their results were expressed as percent replaceability, and deduced from statistical analysis obtained by determining the contribution of each amino acid residue to the antibody binding activity of 103 epitopes analysed. Despite the size of the sample used to establish the scoring, this matrix was incomplete: the authors have completed the set of available data by replacing the non-statistically significant zero values by the values obtained with the symmetric replacements when available (not shown). For example, the value corresponding to the replacement of the parent amino acid Arg by Glu was a non-statistically significant zero, which was replaced by the value corresponding to the replacement of the parent amino acid Glu by Arg (4%). A zero value was attributed to the gaps in the alignments of the sequence of BRU and ELI.

This matrix was then used as follows: each position of a given V3 sequence was considered as a replacement amino acid for the amino acid(s) found in the corresponding position of the different mixotopes. For example, the mixture of Gly, Glu, Lys and Arg found in position 24 of the mixotope 10/235 corresponds to a Gly in the consensus sequence. The equivalence score of the replacement of these four amino acids in the immunizing mixture by the unique Gly in the consensus sequence was then: $(100+13+10+18)/4 = 35.25$. For the same position in the MN sequence, the replacement amino acid is a Lys residue; the score was in this case is: $(12+6+100+67)/4 = 46.25$. These values allow the calculation of a mean similarity score for each individual V3 sequence and each immunogen

by averaging all the amino acids equivalence scores along the peptide sequences.

RESULTS

Selection of the set of sequence data

The design of the mixotopes was based on the set of sequences described by La Rosa¹⁰. However, the authors have discarded the sequences corresponding to the 'BRU' family, in which the Gln-Arg insert in the N-terminal part of the Gly-Pro-Gly motive introduced a bias in the alignment, and could be associated with different replacement rules. Although it has been demonstrated that some sites in the V3 loop of HIV display significant covarying mutations, none are completely exclusive; the authors thus considered the remaining set of 235 sequences as suitable to undertake a mixotope approach.

Design of the mixotopes

The 235 V3 loop sequences were aligned from cysteine to cysteine, and in each position the occurrence of the different amino acids found in the 235 isolates was calculated. Using these values, the consensus peptide was designed to contain, in each position, the most frequent amino acid. In the most degenerated position of the V3 sequences, the selected amino acid was still present in 110 of the 235 sequences. In order to design rationally a series of mixotopes of increasing complexity, several threshold frequencies of occurrence of amino acids were defined. For a defined threshold value, in each position of the sequence, all amino acids which had a frequency of occurrence higher than the threshold value were incorporated in an equimolecular ratio. For instance, with a threshold frequency of 50 among the 235 isolates, three positions were identified (positions 10, 11 and 22), in which two different amino acids exhibited frequencies of occurrence equal to or higher than this value. In the corresponding mixotope, referred to as 'mixo 50/235' two amino acids were simultaneously incorporated into each of these three positions during the synthesis, leading to a mixture of $2 \times 2 \times 2 = 8$ combinatorial peptides in equimolecular ratio. When the threshold frequency was decreased to 30 among 235, the number of degenerated positions increased from three to five (positions 10, 11, 22, 25 and 30) and in two of these positions (11 and 25), three amino acids instead of two were above the threshold. The corresponding mixotope, referred to as 'mixo 30/235', consisted of a mixture of $2 \times 3 \times 2 \times 3 \times 2 = 72$ combinatorial peptides. When the threshold frequency decreased, the number of peptides present in the mixtures increased sharply, corresponding respectively to eight peptides (mixo 50/235), 72 peptides (mixo 30/235), 3840 peptides (mixo 20/235), 552960 peptides (mixo 15/235), 32.5 million peptides (mixo 10/235), 1.5 billion peptides (mixo 8/235) and 27396 billion peptides (mixo 5/235) (Table 1).

Synthesis

Two different approaches were used to prepare the combinatorial peptides. In the 'divide, couple and

recombine (DCR)' method, initially described by Furka¹¹ the peptidyl resin was divided into as many parts as the number of different amino acids which were to be incorporated. Each coupling was then performed individually, in a separate reaction vessel and with a single amino acid. This method has the advantage of avoiding competition between several activated species and allows perfect control of the stoichiometry of the mixture. After couplings had been forced to completion, the different peptidyl resins were recombined again before the next deprotection step. An interesting particularity of this method has been highlighted by Lam *et al.*¹². That is, only a single peptide sequence can be synthesized on each bead of Merrifield resin. This limits the maximum degeneracy of a mixture prepared by the DCR method to the number of beads used during the synthesis. (Typically, a synthesis performed on a millimolar range using beads which carry from 10 to 100 pmol of peptide involves 10^7 – 10^8 beads.) The DCR method was therefore used only to prepare the less degenerated mixotopes (mixo 50/235, mixo 30/235 and mixo 20/235).

In the case of the most degenerated mixotope (5/235 mixotope), assuming that each bead carries a different peptide, a minimum of 100 M of peptidyl resin (roughly 100 kg) would have been required. The authors used the 'mix' method to prepare the most degenerated mixotopes (mixo 15/235, mixo 10/235, mixo 8/235 and mixo 5/235). In this case, an equimolecular mixture of each amino acid present in a degenerate position was directly coupled to the peptidyl resin. A major risk factor is to favor the incorporation of those amino acids in mixtures which have the most favorable coupling rates. This is mainly the case when, as usually occurs in peptide synthesis, a large excess of activated amino acid is used compared with the amino groups available on the resin. To avoid this, the authors modified the synthesis protocol in order to use only one equivalent of acylating mixture per equivalent of peptidyl resin during each first coupling step. Only during the recoupling step was a threefold excess of the acylating mixture used so that, if kinetically-favored incorporations were to occur, this would only involve the limited number of amino groups which remained unacylated after the first step. This protocol was adapted to an automatic peptide synthesizer, and except for the gaps, where the synthesis had to be stopped in order to withdraw a part of the resin from the reaction vessel, all these mixotopes were prepared in a fully automated manner as previously described².

Owing to the heterogeneity of the mixtures, it was not possible (except for the individual peptides and the mixo 50/235) to use any resolutive purification procedure without risking the loss of at least a part of their components. The only common feature to all peptides contained in the mixotopes was an average molecular weight of 4000 Da, which permitted the elimination of smaller molecular weight contaminants by gel filtration. The only control performed on the mixotopes was the determination of amino acid compositions, after total acidic hydrolysis. These compositions were in agreement with the expected theoretical compositions (*Figure 1*). That is, the authors did not observe large differences between observed and

theoretical values, indicating that our synthesizing protocol had limited the risk of preferential incorporation.

All mixotopes are immunogenic and anti-mixotope sera contain a major proportion of antibodies able to react with the consensus peptide

During previous experiments, the authors had observed that mixotopes did not require coupling to a carrier protein to elicit antibodies. Thus, each mixotope and the consensus sequence were simply mixed with complete Freund's adjuvant for the first injection, or with incomplete Freund's adjuvant for the boosts.

A major consideration was whether or not mixotopes were able to raise an immune response against themselves. To answer this question, titers of sera elicited against the consensus or the different mixotopes were determined by ELISA against the parent immunogen (*Figure 2*, left panel). As a control, the authors used as a solid phase antigen an irrelevant 36-residue-long mixotope, designed from a set of repetitive sequences of the internalin of *Listeria monocytogenes*¹³ and containing 1.49×10^{12} sequences. No response above the background signal was observed, even when lower dilutions were used (data not shown).

Although some variability could be observed between the responses of the three animals immunized with each of the mixotopes, even the most degenerated mixtures proved to be immunogenic. That is, for each group of animals, at least one rabbit exhibited a titer comparable to those obtained in the animals immunized with the consensus peptide. A titer inferior to 1000 was observed in one of the three rabbits immunized with the discrete mixture (eight peptides) of the 50/235 mixotope. This observation may be related to a restriction of the immune response, which classically represents a major limitation of the synthetic vaccine approach. The highly degenerated mixotopes 15/235, 10/235 and 8/235 induced an antibody response at a surprisingly high homogeneous level, while the response elicited against the most degenerated 5/235 mixotope (27000 billion peptides) was more heterogeneous, with a very low titer (200) in one of the rabbits.

The sera were assayed during the same experiment against the consensus peptide. By definition, this peptide is present in all mixotopes, although more and more diluted among the increasing number of combinatorial sequences. However, as can be seen in *Figure 2* (right panel), all 24 rabbits exhibited anti-consensus titers, in the same order of magnitude as the titers for the immunizing mixotope. Low responses were observed at the two ends of the degeneracy scale.

The anti-mixotope sera are broadly specific for a family of consensus-related V3 peptides

Serological cross-reactivity between distinct individual V3 peptides was assayed by reacting the sera against consensus-related peptides (consensus, SF2, MN and RF), or against peptides representing more divergent isolates: BRU which differs mainly by the presence of an Gln-Arg insert in the middle of the

sequence, and ELI which presents many divergent mutations (Table 2).

The titers determined against the different individual V3 peptides are represented in Figure 3 for the sera collected from the best responder rabbit in each group. The increase in complexity of the immunogen from the monovalent or discrete mixture (consensus or 50/235), to 72 or even 3840 combinatorial peptides (30/235 or 20/235) leads to a relative increase in the titers against the family of consensus-related peptides (SF2, RF and MN) compared with the anti-consensus titers. The antisera obtained against the more degenerated mixtures are still broadly specific of the

consensus-related peptides. Variations in the recognition of different peptides indicated an ability to distinguish minor changes in the antigens, with a preferential recognition of SF2 and RF over MN. Recognition of BRU was less frequent, and of lower intensity. The most divergent V3 peptide (ELI) was rarely and only weakly recognized.

Inhibition studies of the binding of a representative, anti-8/235 serum

The broad reactivity observed in the sera elicited against the mixotopes can have different explanations.

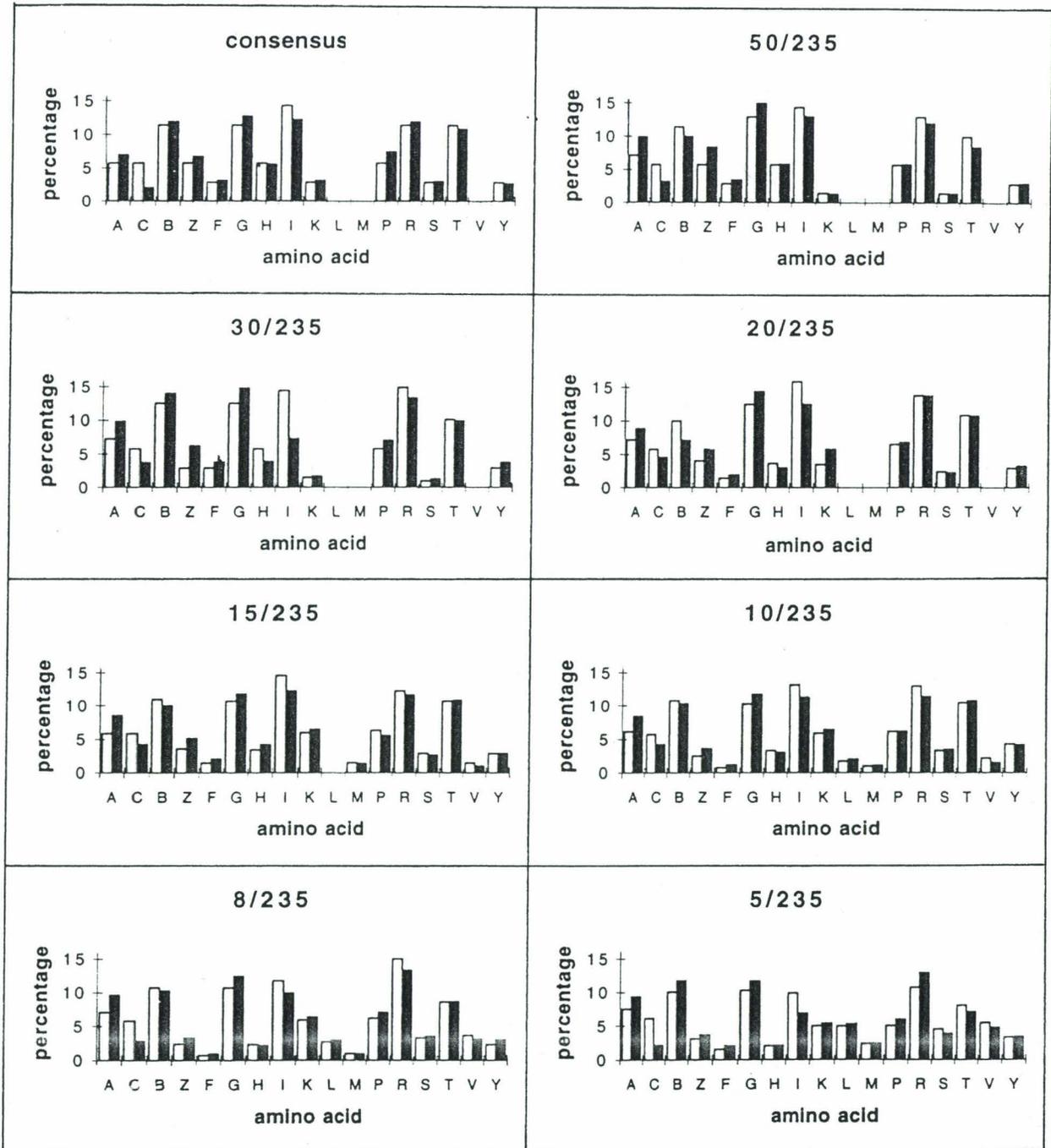


Figure 1 Amino acid composition of the mixotopes, determined after 24 h of acid hydrolysis (white bars), compared with the theoretical composition, calculated on the basis of an equimolecular amount of each amino acid introduced in the degenerated positions (grey bars). One letter code was used for amino acids. B represents Asn or Asp, Z represents Glu or Gln

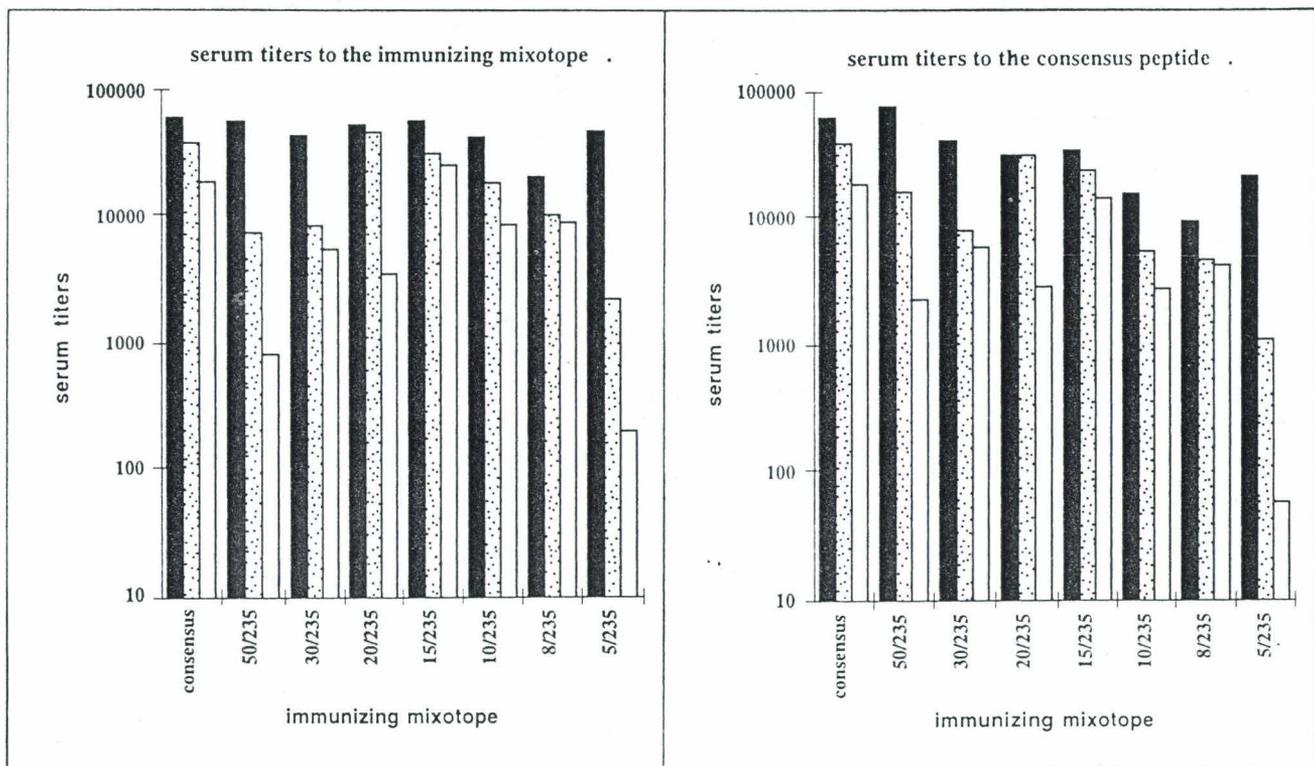


Figure 2 Serum titers of the anti-mixotopes sera. The sera were collected on day 65 in immunized rabbits (three rabbits per immunogen), and were titrated by ELISA against the corresponding immunizing mixotopes (left panel) and the consensus peptide (right panel), used as solid-phase antigens. Titters are expressed as the inverse of the dilution giving a 1 absorbance unit signal. Black bars, best responders; grey bars, mean; white bars: low responders

The sera could contain a mixture of antibodies reacting with many different peptides, or contain cross-reactive antibodies, each able to recognize several distinct epitopes. In an attempt to evaluate the contribution of cross-reactivity in the recognition process, competitive experiments were performed with a representative serum obtained against the strongly degenerated 8/235 mixotope, reacting either to the parent immunogen or to the consensus peptide (Figure 4). The authors observed that the consensus peptide was able to inhibit the interaction of this anti-8/235 serum to the parent immunogen, confirming that most of the antibodies elicited to the 1.5 billion combinatorial peptides contained in the 8/235 mixotope were able to cross-react with the consensus peptide. No efficient inhibiting capacities were found in the 100 μ M range for the other V3 peptides, despite efficient recognition in direct ELISA (shown in Figure 3). However, the population of antibodies selected for its ability to recognize the consensus peptide as solid-phase antigen was partly inhibited by the BRU peptide, and to a lesser extent by the SF2 sequence. These data suggest that the two possible explanations for the broad reactivity observed are not mutually exclusive, and, furthermore, that the anti-mixotope sera could contain a proportion of relatively specific, highly avid populations of antibodies each recognizing a given epitope in a distinct V3 sequence, resulting in high titers observable in direct ELISA. However, the level of degeneracy itself (1.5 billion peptides), that is superior to the available repertoire of antibodies, eliminates the possibility of selecting one antibody molecule per peptide present in the immunizing mixture. That is, the population of antibodies is basically cross-reactive, even if for any

given antibody molecule the panel of acceptable ligands is limited.

Reactivity of the antisera to a given V3 peptide is related to its similarity with the immunizing mixotope

A major concern of the mixotope approach is the risk of losing the specificity of the antibodies when increasing the degeneracy of the immunizing mixotope. It was therefore of interest to evaluate the dependence of the serological cross-reactivity on the sequential similarities between the individual V3 sequences and the immunizing constructs.

According to a reasoning developed by Neurath and Strick¹⁴, the authors have expressed the similarity between the mixotopes and the individual sequences in a quantitative fashion by using the dissymmetric replaceability matrix established by Geysen *et al.*, which represents the biological acceptability of amino acid substitutions in epitopes. The authors calculated the mean similarity scores for all possible antigen-immunogen pairs, as described in the Materials and methods section. These scores were then plotted against the titers to the six different individual V3-peptides obtained in all 24 sera. Although the number of animals (three per condition) were insufficient to establish a definitive statistical study, the repartition of the points was clearly not random (Figure 5).

An interesting characteristic of the recognition by the antisera of the different individual sequences was that most of the points corresponding to the consensus- or 50/235-sera (black symbols) indicated sharp decreases of the titers with increasing dissimilarities in the antigen-immunogen pairs. Conversely, the points

representing the reactivity of the sera elicited against all the other mixotopes indicated a greater tolerance of the recognition process with the diminution of the similarity scores.

DISCUSSION

A commonly accepted research consensus is that the efficient recognition of epitopes relies on a privileged partnership between a given epitopic structure and an antibody combining site. In contrast, the hypothesis tested here was based on the fact that antibodies, instead of being specific for a single amino acid sequence, exhibit a much broader recognition pattern, being able to tolerate important variabilities in some positions. To exploit this phenomenon, the authors

have attempted a combinatorial approach, here termed 'convergent', by creating a peptide mixture that collectively elicits a defined biological response (as opposed to the more usual approach of combinatorial chemistry, in which the libraries represent a 'divergent' diversity, with a concomitant objective of identifying in these mixtures one compound responsible for a given biological activity). Our theory was that a convergent combinatorial mixture, containing essentially closely related molecular species, would be considered as a defined entity by individual recognition molecules of the immune system (antibody, major histocompatibility complex or T-cell receptor), with an apparent concentration high enough to trigger a response. Moreover, when used as an immunizing antigen, the 'mixotope' would preserve a part of the initial degeneracy of the immune response, thus enlarging the diversity of the antibody population towards the recognition of inter-

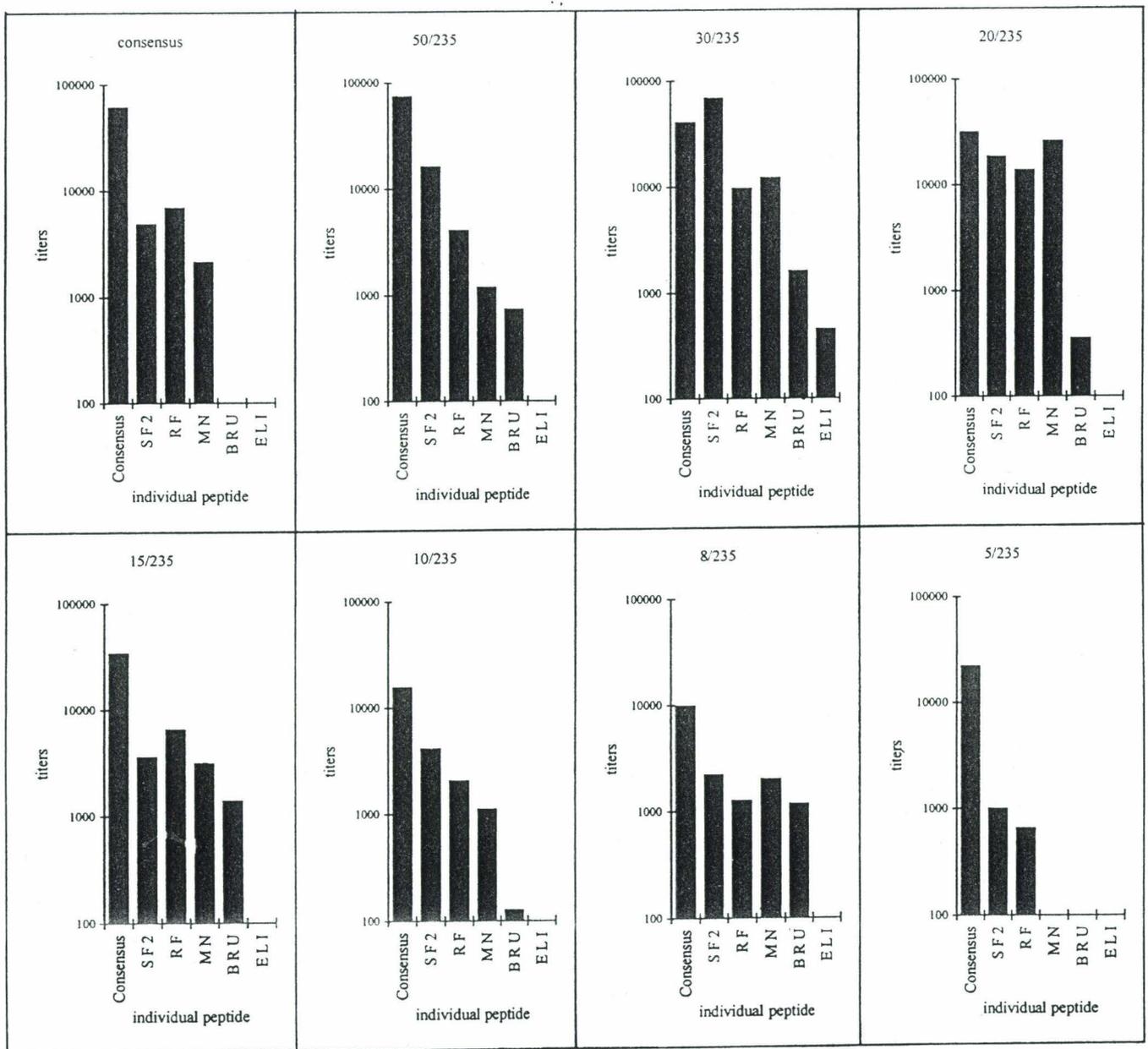


Figure 3 ELISA titers obtained against the different individual V3 sequences with each anti-mixotope sera collected from the best responder rabbits

related but different peptides. This would correspond to the most possible mutated V3-sequences of the HIV-1 neutralizing domain, including their different combinations.

Previous papers demonstrated that mixotopes were able to induce broadly reactive antibody² and cellular^{3,4} responses, and gave rise to the question of the limits of the mixotope approach. For example, (i) at which level of complexity are the advantages obtained balanced by the additional difficulties of production and characterization—with reference to a monovalent immunogen or a discrete mixture of peptides? Furthermore, (ii) to what extent does the number of sequences present in combinatorial immunogens increase the risk of induction of an unwanted immune response? Finally, (iii) is there a limit to the number of peptides in a mixotope?

The most obvious result of this study was that while the complexity of our construct evolved on a 13 log scale, the titers obtained in the animals varied essentially within a 2 log scale. The intensity of the immune response not only to the parent immunogen, but also to the consensus peptide, was practically not correlated to the complexity of the immunogen. A decreased immunogenicity was only observed for the most degenerated mixotope, containing 27000 billion combinatorial peptides. This observation confirmed the hypothesis of a collective biological activity of the

peptides present in the mixotopes, which is much broader than the activity of the consensus peptide itself. While this consensus peptide is actually present in all mixotopes, it becomes more and more diluted as the complexity of the mixotopes increases.

We thus developed our investigations to a more detailed analysis of the serological recognition of a set of peptides representing the diversity of the V3 loop of HIV-1 with reference to the family of virus sequences from which the combinatorial constructs were designed. This set consisted of the consensus peptide, three closely related sequences (SF2, RF, and MN) and two more divergent peptides (BRU and ELI).

Fine variations in recognition by the anti-mixotope antisera of the consensus-related sequences indicated a constant preferential recognition of the consensus peptide itself, and a frequently higher reactivity to SF2 or RF over MN. Thus, despite the increasing complexity of the immunogens, the diversity of the elicited antibody population was relatively limited, being able to distinguish minor sequential changes in the different antigens.

In an attempt to assess the dependence of serological cross-reactivity upon sequence similarity between the immunogen and the antigens, the authors used a dissymmetric replaceability matrix representing the biological acceptability of amino acid substitutions in epitopes to quantify the similarities between the distinct V3 peptide antigens and the immunizing mixotopes. The distribution of the titers to the individual peptides as a function of the similarity scores suggested a correlation which approximated an exponential regression (Figure 5).

The low level of recognition of the distantly related BRU and ELI peptides, rather than the total absence of recognition of some unrelated control peptides (which was actually observed), confirmed the specificity of the antibody recognition. Our observations suggest that the efficient stimulation of immune effector results from collective stimulations of cross-reactive immunocompetent cells by several related, synergistic motifs. In contrast, even if a limited number of components of a mixotope share some homology with V3-non-related sequences, these would be too diluted to benefit such a cooperative effect, and thus would not be able to stimulate significant biological responses.

The better recognition of the consensus peptide by all the anti-mixotope sera, with reference to the other related sequences, also suggests that the natural mutations of the V3 sequence preserve amino acid substitutions that are acceptable in the epitopes expressed by the consensus sequence. The most acceptable amino acids in each position seem to define a limited diversity that converges towards a sequence that is antigenically the best representative of a family of viruses. This could explain the broad reactivity observed in the sera of HIV-1 infected patients, and the suggestion that sequential exposure to HIV variants during infection with a virus with high mutational rate may result in the preferential activation and proliferation of cross-reactive B-cell clonotypes¹⁵. It also suggests that intra-clade neutralization by HIV-1 positive sera is generally weak or sporadic¹⁶. Vaccination strategies based on sequential immunizations with recombinant gp120¹⁷ could take advantage

Competitive inhibition of a 8/235 serum by distinct V3 peptides

solid-phase antigen :

8/235 □

consensus ■

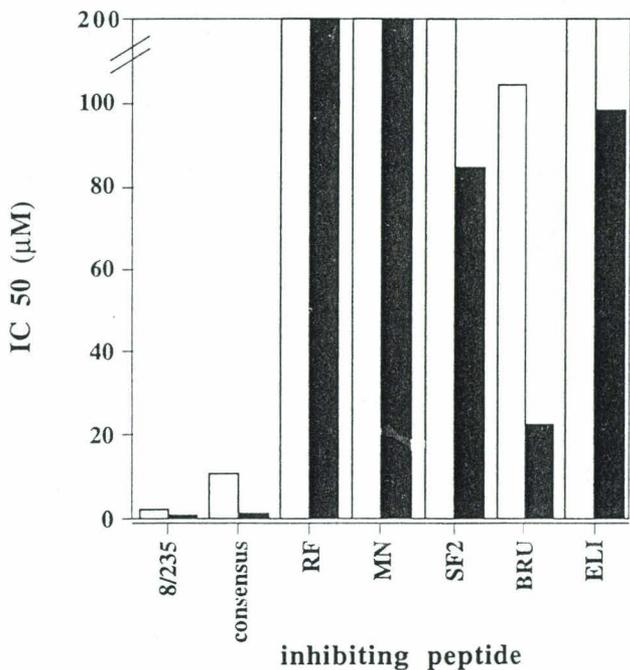


Figure 4 Competitive inhibition of the binding of a 8/235 serum to the parent mixotope immunogen (grey bars, serum dilution 1/20800), or to the consensus peptide (black bars, serum dilution 1/9800)

relations similarity scores / ELISA titers

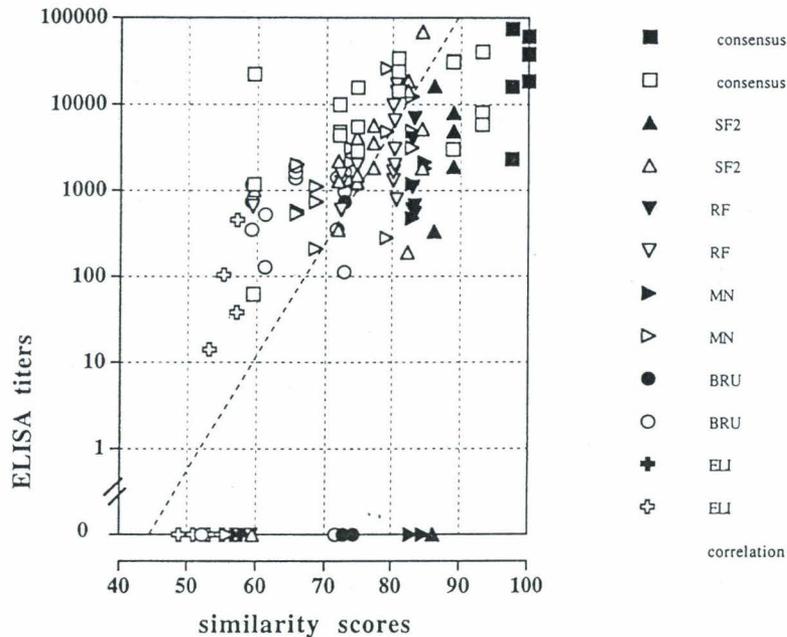


Figure 5 Dependence of the serological cross-reactivity upon sequential similarities between the immunizing mixotopes and the distinct V3-peptide antigens. The similarity scores were calculated as described in the Materials and methods section. White symbols represent values obtained with sera elicited against the 30/235, 20/235, 15/235, 10/235, 8/235 and 5/235 mixotopes. Black symbols represent values obtained with sera elicited against the consensus peptide and the 50/235 mixotope. The dependence approximates exponential regression. The best correlation was found when the results obtained with the consensus- and 50/235-sera were discarded: for the remaining 90 data (dotted line), with a correlation coefficient of 0.795. The circles corresponding to the recognition of the BRU sequence by the different sera were not taken into account. The dots corresponding to the recognition of BRU by the sera are highly dispersed. This could be related to the difficult evaluation of the replaceability of the mixotope middle sequences by the Gln-Arg insert, but also to the great variability of the titers determined on this marginal peptide: only six of the 24 sera recognized BRU with a titer > 1000, while nine sera exhibited no titer. Although these data were represented on the graph, they were not taken into account to calculate the correlations.

of preliminary experiments based on the use of mixotopes to define antigenic families, avoiding for example the introduction of divergent immunogens such as BRU/HTLV-IIIB.

Our observations suggest that the natural variability defined in a statistically homogeneous family of HIV-1 viruses is an optimal basis for the design of combinatorial convergent immunogens (or mixotopes) of limited complexity. These immunogens, which could stimulate cross-reactive B-cells and T-cells simultaneously rather than sequentially, could provide an interesting alternative to strategies based on the sequential approach, or on small size peptides assembled in various configurations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, and from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA.

REFERENCES

- 1 Rusche, J.R., Javahrian, K., McDanal, C., Petro, J., Lynn, D.L., Grimaila, R., Langlois, R.C., Arthur, L.O., Fishinger, P.J., Putney, S.D. and Matthews, T.J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**, 3198–3202.
- 2 Gras-Masse, H., Ameisen, J.C., Boutillon, C., Rouaix, F., Bossus, M., Deprez, B., Neyrinck, J.-L., Capron, A. and Tartar, A. Synthetic vaccines and HIV-1 hypervariability: a 'mixotope' approach. *Peptide Research* 1992, **4**, 211–216.
- 3 Estaquier, J., Gras-Masse, H., Boutillon, C., Ameisen, J.-C., Capron, A., Tartar, A. and Auriault, C. The mixotope: a combinatorial peptide library as a T cell B immunogen. *European Journal of Immunology* 1993, **24**, 2789–2795.
- 4 Estaquier, J., Boutillon, C., Georges, B., Ameisen, J.-C., Tartar, A. and Auriault, C. A combinatorial peptide library around variation of the human immunodeficiency virus (HIV-1) V3 domain leads to distinct T helper cell responses. *Journal of Peptide Science* 1996, **2**, 165–175.
- 5 Anderson, D.E., Malley, A., Benjamini, E., Gardner, M.B. and Torres, J.V. Hypervariable epitope constructs as a means of accounting for epitope variability. *Vaccine* 1994, **12**, 736.
- 6 Tam, J.P., Heath, W.F. and Merrifield, R.B. SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *Journal of American Chemistry Society* 1983, **105**, 6442–6455.
- 7 Vranken, W.F., Budenski, M., Martins, J., Fant, F., Boulez, K., Gras-Masse, H. and Borremans, F.A. Conformational features of a synthetic cyclic peptide corresponding to the complete V3 loop of the RF HIV-1 strain in water and water/trifluoroethanol solutions. *European Journal of Biochemistry* 1996, **236**, 100–108.
- 8 Vranken, W.F., Budenski, J., Fant, F., Boulez, K., Gras-Masse, H. and Borremans, F.A. Conformational features of a synthetic cyclic peptide corresponding to the complete V3 loop of the ELI HIV-1 strain in water. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1996, **61**, 742–750.
- 9 Geysen, H., Mason, T.J. and Rodda, S.J. Cognitive features of continuous antigenic determinants. *Journal of Molecular Recognition* 1988, **1**, 32–41.
- 10 LaRosa, G., Davide, J., Weinhold, K., Waterbury, J., Profy, A., Lewis, J., Langlois, A., Dreesman, G., Neal, R., Bobswell, R.N., Shaddock, P., Holley, L., Karplus, M., Bolognesi, D., Matthews, T., Emini, E. and Putney, S. Conserved sequence

- and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* 1990, **249**, 932-935.
- 11 Furka, A., Sebestyen, F., Asgedom, M. and Dibo, G. General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1991, **37**, 487-493.
 - 12 Lam, K.S., Salmon, S.E., Hersh, E.M., Hruby, V.J., Kazmierski, W.M. and Knapp, R.J. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature* 1991, **354**, 82-84.
 - 13 Gaillard, J.L., Bercehe, P., Frehel, C., Gouin, E. and Cossart, P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive. *Cell* 1991, **65**, 1127-1141.
 - 14 Neurath, A.R. and Strick, N. Confronting the hypervariability of an immunodominant epitope eliciting virus neutralizing antibodies from the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Molecular Immunology* 1990, **27**, 539-549.
 - 15 Boudet, F., Girard, M., Theze, J. and Zouali, M. Antibodies of HIV-1 positive subjects and experimentally immunized primates and rodents bind to sequence divergent regions of the third variable domain (V3) of gp120. *International Immunology* 1992, **4**, 283-284.
 - 16 Moore, J.P., Cao, Y., Leu, J., Qin, L., Korber, B. and Ho, D.D. Inter- and intraclade neutralization of human immunodeficiency virus type 1: genetic clades do not correspond to neutralization serotypes but partially correspond to gp120 antigenic serotypes. *Journal of Virology* 1996, **70**, 427-440.
 - 17 Klinman, D.M., Higgins, K.W. and Conover, J. Sequential immunizations with rgp120 from independent isolates of human immunodeficiency virus type 1 induce the preferential expansion of broadly cross-reactive T-cells. *Journal of Experimental Medicine* 1991, **173**, 881-886.

IV-CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette thèse, nous avons abordé la notion de diversité moléculaire de deux manières différentes, avec des objectifs différents.

Dans les deux cas, des techniques nouvelles ont permis d'engendrer de grandes variétés d'entités moléculaires différentes, de manière combinatoire, c'est-à-dire par l'assemblage covalent et systématique d'un nombre restreint matières premières entre elles.

Ces deux études ont été l'occasion de mieux cerner la notion de diversité moléculaire et de démontrer sa nature ambiguë.

Dans une première partie, nous avons exploré d'une part, les possibilités d'engendrer une diversité d'activité biologiques par synthèse combinatoire, et d'autre part, les méthodes permettant d'identifier et isoler une structure active dans un mélange de congénères. Une bibliothèque conçue et préparée dans ce but, qualifiée de "divergente", a permis de découvrir un ligand nanomolaire du récepteur V2 de la vasopressine. Dans ce cas, clairement, l'activité mise en évidence dans les tests biologiques était due à une petite fraction des congénères,

Dans une deuxième partie, nous avons réalisé des mélanges combinatoires convergents. Le but était d'obtenir une activité biologique de groupe, un continuum d'activité biologique. Les mélanges de congénères (les "Mixotopes") donnant une image floue d'un antigène, devaient être confronté à un récepteur variable et adaptatif : le système immunitaire.

Nous avons réussi à engendrer des populations d'anticorps fonctionnels : en effet, ces anticorps reconnaissent différents variants antigéniques, aussi bien sous forme de peptide isolé qu'au sein de la gp120 protéine parente, à la surface des virus. En outre les populations d'anticorps ainsi engendrées reconnaissent spécifiquement les variants relativement proches des séquences de référence. Aucune réaction croisée avec des séquences non structurellement reliées n'a pu être mise en évidence. L'emploi des règles de sélection naturelles -qui préservent

la fonction biologique- pour la sélection des monomères et la conception des mélanges combinatoire conduit , comme l'on pouvait s'y attendre, à une activité unique même si un nombre astronomique de structures ont été engendrées.

PARTIE EXPERIMENTALE.

Bibliothèques Divergentes CHIMIE

Analyses.

-Chromatographie Liquide Haute Pression:

Les séparations ont été effectuées sur des appareils de marque Shimadzu, à l'aide de colonnes coulées au laboratoire, sous une pression de 350 bars, dans un tampon acétate 20 mM à pH 8 en mélange avec 8 parts de méthanol.

a) Colonne préparative C18 nucléosil 25x200mm. Le système de solvants utilisé est : Solvant A : 0,05% de TFA dans l'eau et Solvant B : Acétonitrile 80% TFA,0,05%. Le débit est de 4,9 mL. Système isocratique à 0% pendant 35 min, puis gradient de 0 à 100% en 90 min (soit 0,11%/min). Détection à 250 nm.

b) Colonne analytique C18 Nucléosil 4,6x250 mm à un débit de 0,5 mL/min Système isocratique à 0% de B pendant 5 min, puis gradient de 0 à 100% de B en 30 min (soit 3,33%/min). Détection à 215 et 254 nm.

-Electrophorèse capillaire.

Les séparations ont été effectuées sur un appareil PerkinElmer dans un tampon de borate 20 mM à pH 9,4. Les analytes chargés ou non migrent dans ce tampon grâce au courant d'électroendosmose engendré par la tension appliquée entre les extrémités du capillaire. Ce courant d'ions solvatés le long du tube de silice provoque un mouvement de solvant qui entraîne les analytes. Ces analytes sont séparés en fonction de leur capacité à résister ou à être entraînés par le courant d'électroendosmose. Cette capacité dépend de leur masse moléculaire, de leur taille ainsi que de leur charge nette qui est responsable de l'établissement d'une force électromotrice retardatrice ou accélératrice.

L'électrophorèse capillaire peut être considérée comme une méthode analytique orthogonale à l'HPLC en phase inverse. Une homogénéité de comportement analytique dans ces deux systèmes est donc une indication fiable de la pureté des produits analysés.

- Spectrométrie de masse

Les analyses sont faites sur un appareil Bio-Ion/ Applied Biosystem. Les ions sont engendrés par bombardement d'une cible de nitrocellulose sur laquelle est adsorbé l'analyte, avec les fragments de fission du Californium ²⁵²Cf. Les cibles de mylar aluminisées sont d'abord enduites d'une très fine couche de nitrocellulose, par la méthode du "spin-drying" à l'aide d'une solution de nitrocellulose à 20 mg/mL dans l'acétone. Après évaporation complète de l'acétone, la solution à analyser (acétonitrile ou eau) est déposée sur une cible en rotation. Les analytes s'adsorbent sur la nitrocellulose et le solvant est éjecté radialement. La cible ainsi imprégnée des analytes est introduite dans la chambre d'ionisation sous vide et soumise au bombardement par les fragments de fission du Californium. Le rapport m/z des ions éjectés de la cible est calculé grâce à la mesure du temps de vol des ions accélérés par une tension de 15kV

Préparation des acides aminés protégés.

- Synthèse de l'acide N-tBoc Isonipécotique.

13g (0,1 mole) d'acide isonipécotique sont dissous dans 20 mL d'eau et 50 mL de tertibutanol avec 4 g (0,1mole) de soude. On ajoute 26,3 mL de (Boc)₂O (0,11mole) et on laisse en agitation une nuit à température ambiante. Le volume est enfin étendu de 100 mL d'eau et extrait 3 fois par 150 mL de pentane. La phase aqueuse est acidifiée à pH 3 par l'acide

sulfurique et extraite par 3 fois 200 mL d'acétate d'éthyle. La solution de tBoc aminoacide dans l'acétate d'éthyle est séchée sur sulfate de sodium et l'acétate d'éthyle est évaporé à 30°C sous pression réduite. On obtient 22 g d'une poudre blanche. r = 96%

Ccm : AcOEt-MeOH-AcOH 6/10/1 Rf = 0,83. Révélation par minéralisation à l'épiradiateur.

Le réactif pour catalyser la minéralisation est le réactif de Charring.

(Sulfate d'ammonium 20g, Acide sulfurique concentré 4 mL, eau 100 mL, en pulvérisation sur la plaque).

Le test Christensen (tétrachlorobenzoquinone-toluène-acétone) est négatif.

¹H NMR (300 MHz, DMSO d6 20°C)

δ = 1.40 (s, 9H : tBu); 2,41 (t t, J = J_{60°} = 3.76 Hz, J_{180°} = 14.7 Hz, 1H : H_α) 3.80 (m 2H); 2.82 (m, 2H); 1.80(m, 2H) 1.38(m, 2H)

- Synthèse de la tBoc D-Méthionine S-sulfoxyde.

6,23 g (25 millimoles) de tBoc D méthionine sont dissous dans 50 mL de solution aqueuse de phosphate dipotassique 1M. On ajoute 6,09 g (24 millimoles) d'iode solubilisés dans 125 mL d'éthanol., et progressivement 4,48g (80 millimoles) d'hydroxyde de potassium sont ajoutés (2,24 à t0, 1,5 à t0 + 30 min, 0,5 à t0 + 14 h puis le reste à t0 + 20 h. Ainsi pendant 24 h le pH est maintenu entre 7 et 7,5. Et la solution après 24 h d'agitation est jaune très pâle. L'excès d'iode est éliminé par le bisulfite de sodium et les iodures sont précipités par une solution aqueuse de nitrate d'Argent (50 millimoles). Après un ajout de 200 mL de méthanol, la suspension est centrifugée et le surnageant débarrassé du précipité d'iodure d'Argent est acidifié à pH 3 par l'acide sulfurique concentré. La phase aqueuse est extraite par 1 fois 50 mL d'éther éthylique pour entraîner la méthionine résiduelle puis 6 fois 200 mL d'acétate d'éthyle. Les 6 dernières extractions sont contrôlées par CCM pour leur pureté en sulfoxyde, réunies, déshydratées par le sulfate de sodium anhydre et évaporées sous pression réduite à 45°C. On obtient 63 % de rendements.

¹H NMR (300 MHz, DMSO d6 20°C)

δ = 1.39 (s : 9H : tBu); 2.0 (m : 2H : H_β); 2.54 (s 3H : H_ω) 2.73 (m, 2H : H_γ) 3.98 (m, 1H : H_α)

- Synthèse de la N_α-tBoc(β-trityl) D-Asparagine

cette synthèse a été réalisée selon le mode opératoire décrit dans Tetrahedron Lett. Vol32 N°6 p 739sq.

6,1 g (50 millimoles) d'Asparagine, 26 g de triphénylméthanol (100 millimoles), 10 mL (100 millimoles) d'anhydride acétique et 3 mL d'acide sulfurique concentré sont suspendus dans 200 mL d'acide acétique glacial et agité pendant 75 minutes à 60°C. La solution est ensuite lentement ajoutée à 500 mL d'eau à 0°C et le pH de la suspension lentement ajusté à 6 avec une solution de soude 10N. Après une heure à 0°C, les cristaux sont soigneusement lavés par 1,5 L d'eau distillée puis 1,5 L de toluène, puis enfin séchés. (10,2 g 37 millimoles rendement 74%) 10 g de H-(trityl) Asparagine-OH ainsi obtenue sont ensuite dissous dans 40 mL d'eau et 40 mL de tertiobutanol avec 1,4 g (35 millimoles) de soude. 40 millimoles de tBoc pyrocarbonate sont ensuite ajoutés. Après 12h de réaction à pH 8, la solution obtenue est diluée par 100 mL d'éther éthylique et 100 mL d'eau. La phase aqueuse est lavée par le toluène et ensuite acidifiée à pH 3 par l'acide sulfurique en présence d'acétate d'éthyle. On extrait la tBoc(b-trityl) Asparagine par 4 fois 100 mL d'acétate d'éthyle. L'évaporation de l'acétate d'éthyle sous pression réduite à t° < 35°C. conduit à la cristallisation de 11 g de tBoc(b trityl)asparagine contrôlée par CCM Rf = 0,8 (CHCl₃ CH₃OH AcOH 80/15/5 V/V/V).

¹H NMR (300 MHz, DMSO d6 20°C)

$\delta = 1.41$ (s, 9H : tBu); 2.62 (m, 2H : H β); 4.10 (m, 1H : H α); 6.96 (d, J = 8.4 Hz, 1 H : NH α); 7.2 (m, 15H : H $_{ar}$); 8.67 (s, 1H : NH).

Synthèse peptidique.

Tous les produits de nature peptidique sont synthétisés en phase solide à partir de la résine de Merrifield (polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène, 200-400 mesh, 0,7 mmol/g, Novabiochem)

- Synthèse du tBoc Gly O-méthylénopolystyrène

525 mg (3 millimoles) de tBoc Gly (Propeptide) sont dissous avec 490 mg (1,5 millimoles) de carbonate de Césium anhydre dans 5 mL d'eau et 20 mL d'éthanol. La solution est évaporée à 40 °C sous pression réduite et l'eau résiduelle est ensuite entraînée par le mélange toluène-éthanol absolu 1/1 V/V. Le tBoc Gly sel de Césium est dissout dans 20 mL de DMF et on ajoute à la solution 2,85g (2 millimoles) de résine chlorométhylée à 0,7 mEq/g 100-200 mesh (Novabiochem 01-64-0008 A05435). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation douce pendant 24h à 50°C. La résine est ensuite lavée par 3 fois 50 mL de DMF, 3 fois 50 mL de DMF-Eau 1/1 V/V, 3 fois 50 mL DMF-éthanol 1/1 V/V, 3 fois 50 mL d'éthanol, 3 fois 50 mL de méthanol puis 3 fois 50 mL de chlorure de méthylène. Elle est enfin séchée. Les 7 premiers lavages sont réservés, évaporés et repris dans 100 mL d'eau bipermutée pour un dosage des chlorures selon Charpentier-Volhard.

Toutes les aminoacylrésines ont été synthétisées selon ce protocole. Le tableau suivant réunit les données concernant les synthèses des résines utilisées.

Résine :	% Rendement (déplacement des Chlores)	Poids théorique (sans pertes)	Poids obtenu (pertes mécaniques en gr)	Charge (millimoles /gr)
Glu(Obzl)	0,95	6,85	6,72	0,55
Gly	0,88	6,20	6,20	0,57
Ala	0,95	6,29	6,12	0,60
Arg(Tos)	0,66	6,75	5,97	0,39
Asp(Obzl)	0,96	6,81	6,44	0,56
Gln	0,90	6,47	5,36	0,56
IsoGln	0,95	6,50	6,40	0,58
His (p-Bom)	0,91	6,94	6,94	0,52
Phe (4-NO ₂)	0,86	6,66	6,75	0,52
Ile	0,95	6,48	6,45	0,59
Phe	0,91	6,54	6,22	0,56
Lys (Nic)	0,95	6,92	6,73	0,55
Ipe	0,98	6,46	6,42	0,61
Leu	0,87	6,42	6,34	0,54
Pro	0,96	6,40	6,10	0,60
Ser (Bzl)	0,96	6,70	6,21	0,57
Tic	0,97	6,63	6,50	0,58
Glu Obzl	0,95	6,85	6,81	0,55
Thr (Bzl)	0,96	6,76	6,76	0,57
Tyr(2-BrZ)	0,95	7,45	6,99	0,51
Trp (For)	0,96	6,85	6,66	0,56
Val	0,97	6,40	6,40	0,60
Met (O)	0,99	6,62	6,32	0,60

Asn (Trt)	0,75	7,02	n.d.	0,45
Lys (2-ClZ)	0,94	7,14	7,30	0,53

- Dosage de Charpentier Vohlard.

Le dosage des chlorures libérés lors de cette réaction est réalisé par la méthode de Charpentier-Vohlard, qui est un dosage par retour des halogénures, le résidu sec obtenu après évaporation est repris par un volume connu d'eau bipermutée et solubilisé. A une prise d'essai de volume précisément connu de cette solution aqueuse, on ajoute un volume connu de nitrate d'argent titré, 5 mL d'acide nitrique, 1 mL de nitrobenzène, et 1 mL d'alun de fer ammoniacal. L'excès d'ions Ag^+ est dosé par une solution titrée de thiocyanate de Potassium.

- Test colorimétrique de dosage de fonctions amines libres utilisé dans le contrôle en cours de synthèse des deux séries partitions orthogonales dit de « Kaiser ».

Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui mesure la quantité d'amine primaire a carboxylique d'une prise d'essai, en solution ou sur résine. A un poids connu de résine, on ajoute : 100 μL de Phénol dans l'éthanol (7:3 V:V), 100 μL de ninhydrine 0,28 M dans l'éthanol et 100 μL de KCN 0,2 mM dans la pyridine. On laisse incuber 5 mn à 100 °C, on ajoute 470 μL de méthanol et on lit la DO à 570 nm, connaissant le coefficient d'extinction molaire du pourpre de Ruheman, 15000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, on peut déterminer la quantité d'amine présente dans la prise d'essai⁵¹.

- Test qualitatif pour la détection d'amines secondaires dit de Christensen.

A une prise d'essai de résine correctement lavée, on ajoute 0,5 mL d'acétone et 0,5 mL d'une solution saturée de tétrachloroparabenzoinone dans le toluène. Si des fonctions amines secondaires sont présentes sur le polymère, on observe une coloration noire des grains de résine.

NB : Ce test est beaucoup moins sensible que le test à la ninhydrine de Kaiser.

- Protocole de clivage et déprotection à l'acide fluorhydrique utilisé pour la préparation des 2 séries-partitions orthogonales.

Une quantité de peptidylrésine correspondant à la moitié (150 millimoles) du lot de synthèse, est déprotégée par 1x2 et 1x20 minutes de TFA/ CH_2Cl_2 50/50 V/V . Ce lot de résine est traité systématiquement, et même en l'absence de tryptophane, par la pipéridine à 10% dans la NMP pendant 2 heures. Après ces deux heures la peptidylrésine est lavée 3 fois dans la NMP puis trois fois dans le dichlorométhane puis séchée.

Le lot de résine est ensuite mis à gonfler dans un mélange de 125 mg de p-thiocrésol et de 375 mg de p-crésol. Le réacteur étant plongé dans l'azote liquide, on laisse condenser 5 mL de fluorure d'hydrogène anhydre, et on laisse remonter la température à 0°C par immersion des réacteurs dans un bain de glace. Le mélange réactionnel est laissé à 0°C pendant 90 minutes. On évapore ensuite l'acide fluorhydrique sous pression réduite à 0°C. La fraction peptidique est ensuite précipitée dans l'éther éthylique ajouté goutte à goutte. Le mélange est centrifugé à 5000 tr/minute pendant 5 minutes. Le culot de peptide est ensuite recueilli et dissout dans 3 mL d'acide trifluoroacétique. la solution acide de peptide est jetée goutte à goutte dans 140 mL d'éther éthylique à sa température de fusion. Le précipité de peptide ainsi obtenu est recueilli par une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 5000 tr/minute. Le peptide, qui est toujours accompagné de la résine et d'un léger surnageant d'éther, est alors repris dans 30 mL d'acide acétique à 3%. Cette solution limpide recouverte d'une phase étherée contenant la résine, est filtrée sur filtre Millipore Téflon 5 mm après une évaporation sous azote de l'éther résiduel, et lyophilisée. il faut procéder à deux lyophilisations pour obtenir une poudre. La

congélation avant sublimation doit se faire dans l'azote liquide ou au maximum à -80°C , si l'on veut disposer d'assez de temps entre la sortie de congélation et la mise en vide de l'enceinte de lyophilisateur.

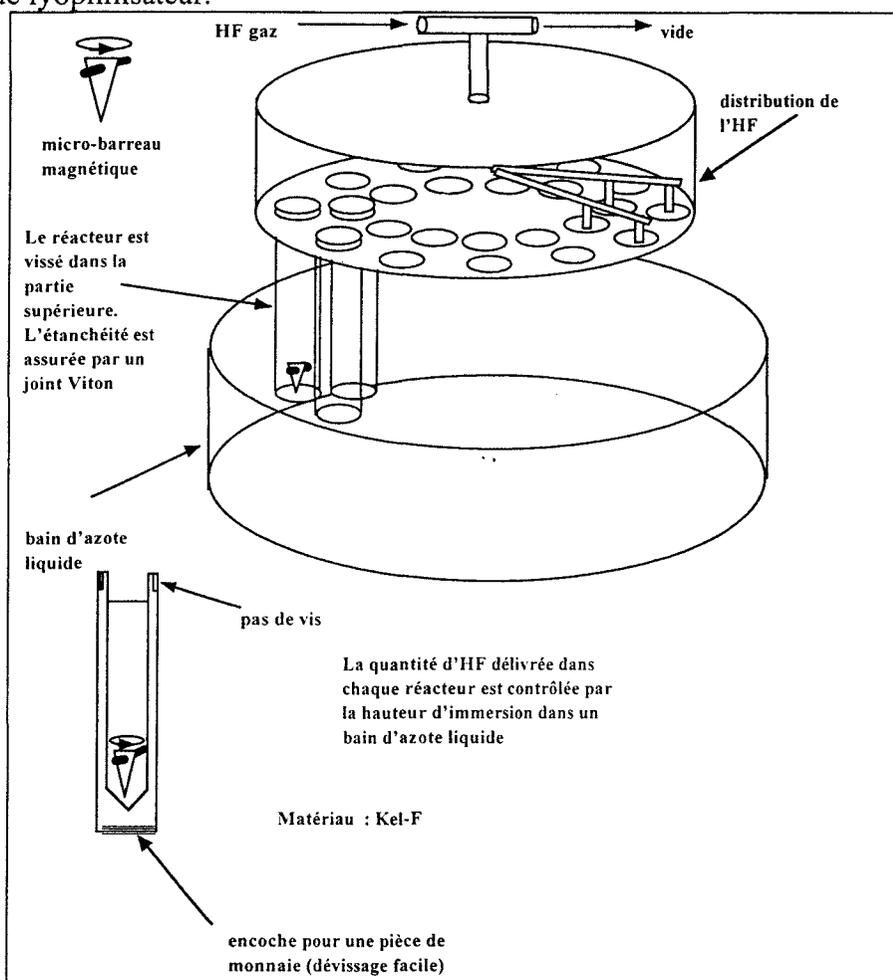


Figure 18 : Schéma du dispositif de clivage HF à 24 réacteurs.

- Protocole de synthèse utilisé pour la synthèse simple des tripeptides actifs. cas du H-D Tic-D Tyr-D Pnp-OH.

30 μmol de tBoc-D-Pnp-O-Polymère (52 mg) sont déprotégées par une solution d'acide trifluoroacétique à 50% dans le DCM pendant 2 mn puis 20 mn, elles sont ensuite lavées par le DCM, neutralisées par une solution de DIEA à 5% dans le DCM, rincées 2 fois au DCM, et enfin 3 fois au DMF, à chaque fois pendant 2 mn. L'acylation de l'amine est ensuite réalisée par mise en contact avec 4 Eq de tBoc-D-Tyr (2BrZ)-OH (0,12 mmol) en présence d'HBTU (0,12 mmol, 45,5 mg) d'HOBT (0,12 mmol, 18,4 mg) et de DIEA (0,48 mmol, 83,8 μL) dans le DMF. On réalise un test de Kaiser. La synthèse se poursuit par l'ancrage tBoc-D-Tic-OH (0,12 mmol) dans le DMF, strictement dans les mêmes conditions que précédemment. On réalise la déprotection de l'amine terminale par le TFA à 50 % dans le DCM, on rince la résine par le DCM, on la sèche.

Cette résine est ensuite soumise à un clivage à l'acide fluorhydrique.

Rdt : 22,1%, pureté HPLC : 87,6% (Rt = 22,4 mn)

PM attendu = 529,6 ; M/z obtenu = 531.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O , DCl, pH=1) :

2,75 (dd, $J = 6,1$ Hz, 1 H, H_{b_2} 4-nitroPhe); 2,80 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H : H_{b} Tyr); 2,91 (m, 1 H : H_{b_2} Tic); 3,02 (dd, $J = 6 \cdot 14$ Hz, 1 H : H_{b_1} 4-nitroPhe); 3,10 (m, 1H : H_{b_1} Tic); 4,10 (m, 1 H :

H_a Tic); 4,28 (2 d, 2 H, CH₂NH Tic); 4,42 (t, J = 7,8 Hz, 1 H : H_a Tyr); 4,45 (dd, J = 5,1 ; 11 Hz, 1 H : H_a 4-nitroPhe); 6,69 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H₃, H₅ Tyr); 6,95 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H₂, H₆ Tyr); 7,25 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H₂, H₆ 4-nitroPhe); 7,1 (d, J = 7,3 Hz, 1 H : H₅ Tic); 7,35 (d, J = 8,5 Hz, 2 H : H₃, H₅ 4-nitroPhe); 7,18 (m, 3 H : H₂, H₃, H₄ Tic).

BIOLOGIE

Tests de Liaison

Les manipulations ont été effectuées par la société CEREP.

Les expériences sont réalisées sur des cellules d'épithélium rénal de porc de la lignée LLC-PK₁. La molécule de référence est l'arginine-vasopressine ou "AVP", les conditions expérimentales mettent en présence le récepteur V₂, le ligand marqué (³H)AVP à la concentration de 3nM, l'AVP froide à la concentration de 2 mM, pendant 180 mn, à 4 °C. Après l'incubation, les cellules sont rapidement filtrées puis lavées par du tampon froid. Les filtres sont alors transférés dans des fioles contenant du liquide scintillant et la radioactivité fixée est déterminée par un compteur à scintillation liquide. La liaison spécifique du ligand radioactif sur les récepteurs est calculée par la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique déterminée en présence d'un excès de ligand non radioactif.

Pour les produits purifiés, les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibant de 50% la liaison spécifique) sont calculées pour la molécule de référence (AVP), à partir de la courbe de compétition selon un modèle de régression non linéaire. Tous les composés de cette étude sont solubilisés dans le DMSO pour l'obtention de solutions mères à la concentration de 5 mg/mL. Les dilutions ultérieures sont effectuées dans l'eau.

Les tests d'inhibition de l'adénylate cyclase ont été réalisés pour déterminer l'effet de la liaison du ligand H-DTic-DTyr-DPnp-OH sur le récepteur V₂. Ces tests ont été réalisés aux Laboratoires Glaxo. Des cultures confluentes de cellules LLCPK1 ont été incubées avec ou sans Vasopressine (1 nM) en présence d'IBMX (500 µM), avec différentes concentrations de ligand.

Après 10 minutes d'activation, l'AMP cyclique intracellulaire a été extrait par addition d'éthanol à 70%. Les extraits éthanoliques ont été évaporés et les quantités d'AMP cyclique ont été déterminées par le kit SPA (« Scintillation Proximity Assay ») de chez Amersham. Une inhibition de la production d'AMP cyclique induite par la vasopressine indique que le ligand est un antagoniste. La puissance des antagonistes est donc donnée par l'IC₅₀, relativement à la Vasopressine utilisée à la concentration de 1 nM.

Bibliothèques Convergentes

Analyses :

- Analyse d'acides aminés.

Les peptides ou les mélanges de peptides préparés dans la section III ont été hydrolysés totalement par un traitement à 110 °C pendant 24 heures dans l'acide chlorhydrique 6N, sous vide avec 1% de phénol comme antioxydant. Les acides aminés présents dans l'hydrolysat ont été analysés par chromatographie d'échange ionique et quantifiés par réaction avec la ninhydrine à chaud en aval de la colonne. Cette analyse est réalisée sur un analyseur automatique Beckman 7300.

- Spectrométrie de masse.

Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre de masse de type BioIon 20, de la façon décrite précédemment. La précision nominale de l'appareil est d'environ 0,1%. Des écarts de 3 uma entre [M+H]⁺ et le m/z mesuré sont donc admissibles.

Les résultats obtenus pour les peptides purs sont regroupés dans le tableau suivant :

Peptide	[M+H] ⁺ théorique	m/z expérimental
Consensus	3941	3942
MN	3983	3984
RF	3737	3739
SF2	3822	3822
BRU	3950	3952
ELI	3731	3733

- Analyses par HPLC.

Des aliquotes de 10µL de solutions à environ 1mg/mL ont été déposés sur une silice greffée en C18 (porosité : 300 Angstroms, granulométrie : 5µm) Vydac, dans une colonne de 25 cm de long sur 4,6 mm de diamètre. Un système d'élution en gradient est utilisé avec des pompes Shimadzu à 0,7 mL/min. Le solvant "A" est Eau TFA 0,05%, le solvant "B" est Eau Acétonitrile 20/80 TFA 0,0425%. Tous les peptides ont migré en formant un seul pic symétrique.

Synthèse :

- Synthèse des Mixotopes :

Tous les Mixotopes (sauf les 50, 30 et 20/235 de la deuxième série) ont été synthétisés en phase solide selon la stratégie tBoc-Benzyle, à l'aide d'un synthétiseur de type ABI430A. La résine utilisée était une tBoc Cys (pMeBzl)-PAM*. 0,5 millimole de cette résine a été mise en jeu pour ces synthèses. La DCC (N, N'-dicyclohexylcarbodiimide) a été utilisée avec l'HOBt (1-hydroxybenzotriazole) pour les activations.

Les programmes utilisés pour les étapes combinatoire est édité dans la figure @. Le premier programme "RMULTIPL" régit les temps de couplage, de déprotection ainsi que les arrivées et les départs de solvants et de réactifs, du réacteur de contenant la résine, le "reaction vessel". Le second programme "AMIXO" régit les mises en solution des tBoc aminoacides, ainsi que leur activation.

A chaque fois qu'un couplage fait intervenir un mélange d'acides aminés, ces deux programmes non standard sont utilisés.

Le premier couplage se fait avec 1 Eq de mélange d'acides aminés, c'est-à-dire 0,5 millimoles. Le deuxième couplage se fait avec 2 Eq de mélange, c'est-à-dire 1 millimole. Ces deux étapes de couplage durent 83 minutes. Entre les deux couplages, l'automate effectue 3 lavages au DCM et cinq lavages à la N-méthylpyrrolidone (NMP), en alternant introductions haute et basse des solvants. Après le dernier essorage on introduit 540 µL de NMP pour humecter la résine et empêcher les réactifs introduits ultérieurement de passer au travers du lit de résine et du fritté. Les tBoc aminoacides sont introduits en solutions équimolaires dans un mélange N-méthylpyrrolidone/DCM 7:3 dans un volume total de 3 mL quelque soit la quantité (0,5 ou 1 millimole) de mélange). Au moment de l'activation est introduit dans les cartouches 1 mL (ou 2 mL pour le deuxième couplage) d'une solution 0,5 M d'HOBt dans la NMP, 840 µL de NMP et 1460 µL de DCM. Le volume total dans la cartouche est donc de 6,3 ou 7,3 mL. Cette solution est ensuite conduite dans le réacteur d'activation pour y être mélangée à 1mL (ou 2mL pour la deuxième activation) d'une solution 0,5 M de DCC dans la NMP. Le mélange est agité pendant 43 minutes. Ce temps d'activation maximisé doit permettre d'activer des mélanges d'acides aminés contenant des acides aminés aux cinétiques d'activation rapides comme la tBoc-Glycine ou lentes comme la tBoc-Arginine (tosyle). Après cette période d'activation, la Dicyclohexylurée précipitée est retenue dans le réacteur d'activation par filtration et le mélange d'esters d'HOBt obtenu est transféré dans le réacteur contenant la

résine. Le couplage dure 83 minutes. A la minute 45, on procède à un ajout de 3,21 mL de DMSO. Après ce couplage, le résine est lavée trois fois avec du DCM et 5 fois avec la NMP. On réalise ensuite systématiquement un second couplage dans les mêmes conditions hormis la quantité d'acide aminé activé, qui est de 1 millimole (2Eq).

L'étape de déprotection est réalisée de la façon suivante après les lavages. La résine est soumise à un prédéprotection rapide de 2,5 minutes avec du TFA à 50% dans le DCM. Cette première étape de déprotection permet de cliver une grande partie des groupements tBoc, et évite les réactions secondaires entre la peptidylrésine et les cations t-Butyliques. La déprotection est ensuite terminée par action d'une solution de TFA à 70% dans le DCM pendant 15 minutes. Après la déprotection l'automate effectue, pendant que les acides aminés du cycle suivant sont en cours d'activation, 4 lavages au DCM, 1 neutralisation à la DIEA à 5% suivie d'un lavage à la NMP, et d'un lavage à la NMP contenant 5% de DIEA.

Après l'assemblage des chaînes peptidiques, le tBoc terminal est clivé au TFA à 50% et la résine séchée. Le clivage et la déprotection sont réalisés selon le protocole "Low and High HF"⁵². Après deux heures à 0°C dans une solution à 25% d'acide fluorhydrique dans le Diméthylsulfure, la résine est soumise (après élimination du diméthylsulfure par distillation sous vide) à un mélange HF/p-crésol/p-thiocrésol 9:0,75:0,25 pendant 1 heure, toujours à 0°C. Les mélanges de peptides ainsi obtenus sont précipités dans l'éther éthylique, récupérés par filtration, redissous dans l'acide trifluoroacétique pur, isolés de la résine par filtration, reprécipités dans l'éther, dissous une nouvelle fois dans le minimum d'acide trifluoroacétique et reprécipités dans l'éther.

Après une étape de lyophilisation, les mélanges de peptides ont été "chromatographiés" sur G10 dans un tampon acétate. Les premières fractions ont été collectées, réunies et lyophilisées.

Analyse d'acides aminés obtenue sur le Mixotope le plus dégénéré 8/235 :

Aminoacide	Fraction théorique	Fraction trouvée	Ratio
Alanine	2,46	<u>3,05</u>	1,25
Cystéine	2	<u>0,90</u>	0,45
Aspartique et Asparagine	3,73	<u>2,30</u>	0,61
Glutamique et Glutamine	0,83	<u>1,05</u>	1,26
Phénylalanine	0,25	<u>0,29</u>	1,16
Glycine	3,70	<u>3,98</u>	1,07
Histidine	0,81	<u>0,69</u>	0,85
Isoleucine	4,08	<u>3,17</u>	0,78
Lysine	2,04	<u>2,04</u>	1,00
Leucine	0,92	<u>0,94</u>	1,02
Méthionine	0,33	0,29	0,87
Proline	2,14	<u>2,28</u>	1,06
Arginine	5,18	<u>4,27</u>	0,82
Sérine	1,14	1,11	0,97
Thréonine	2,97	2,78	0,93
Valine	1,25	<u>0,98</u>	0,78
Tryptophane	0	nd	nd
Tyrosine	0,81	0,97	1,20

Les valeurs soulignées correspondent aux aminoacides les plus stables lors de l'hydrolyse acide totale. Ce sont ces valeurs qui ont été utilisées pour déterminer la quantité de Mixotope mise en jeu lors de l'hydrolyse.

Procédure d'hyperimmunisation des lapins.

A J0, des lapines de type "NéoZélandais" (3 par immunogène) ont été immunisées par injection sous-cutanée dans la région de l'omoplate d'une solution de peptide ou de Mixotope à 1mg/mL dans un tampon phosphate pH 7,4 isotonique émulsionnée dans l'adjuvant complet de Freund.

A J15, J37 et J57, ces lapines ont reçu des rappels des mêmes immunogènes émulsionnés dans l'adjuvant incomplet. Les prélèvements sanguins (10 à 20 mL) ont été effectués par dépression au niveau de la veine auriculaire à J0 avant l'immunisation à J44 et J65.

Procédure de titration des serum par la technique du test immuno-enzymatique (ELISA).

Des plaques de microtitration de 96 puits (Nunc) ont été incubées pendant une nuit à température ambiante avec 200 µL de d'une solution à 10µg/mL des antigènes (peptide ou Mixotope) dans un tampon 50 mM carbonate/bicarbonate de Sodium à pH 9. Les sites polystyrènes restés libres ont été saturés grâce à une incubation de 1 heure à 37°C avec une solution à 1% de caséine 1,8% NaCl 10mM de phosphate à pH 7,2. Après quatre lavages de chaque puits avec 250 µL./puits d'une solution 1,8% NaCl 10 mM phosphate de Sodium à pH7,2 caséine 1%, des dilutions de 2 en 2 des serum dans un tampon phosphate de sodium à pH7,2 1% caséine, 1,8% NaCl ont été réalisées et disposée en double dans les puits. Après deux heures d'incubation à 37°C, les dilutions de serum ont été retirées des puits. La présence d'immunoglobulines de type G a été mesurée par addition de 200 µL d'une dilution au 1/10.000 d'un serum de chèvre anti Immunoglobuline G de lapin couplé à la peroxydase du Raifort (vendu par Diagnostic Pasteur), dans un tampon phosphate de sodium à pH7,2 1% caséine, 1,8% NaCl. Après une incubation de 2 heures à 37°C avec ce conjugué, les puits sont lavés quatre fois. 200 µL d'une solution dans un tampon citrate pH 4 d'orthophénylènediamine et de peroxyde d'hydrogène est ensuite introduite dans chaque puits. Après 30 minute de réaction, à température ambiante à l'abris de la lumière, la réaction est stoppée par addition de 50 µL d'acide sulfurique 4N. L'absorbance à 492 nm est immédiatement mesurée à l'aide d'un photomètre Dynatech. Le bruit de fond est évalué avec le signal donné par les serum préimmuns dilués au 1/100. Ce signal était inférieur à 10 mUA. Les titres des serum sont définis comme l'inverse de la plus haute dilution donnant 1 UA d'absorbance.

Expérience d'inhibition de liaison.

Le serum du lapin le meilleur répondeur au Mixotope 8/235 a été utilisé. Les antigènes Consensus et Mixotope 8/235 ont été adsorbés sur les plaques comme décrit précédemment. Les serum à inhiber ont été utilisés à la dilution donnant 1UA d'absorbance dans le test précédent. Ces serum ont été prémélangés avec 200 µL de différentes dilutions sérielles de 5 en 5 (1/1, 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/15625) des différents inhibiteurs. Ces inhibiteurs ont été le Mixotope 8/235, Consensus, RF, SF2, MN, ELI et BRU. Les immunoglobulines liées ont été mesurées comme précédemment. Les capacités d'inhibition ont été exprimées par les IC50 : concentration d'inhibiteur donnant un signal de moitié égal au signal obtenu sans inhibiteur.

-Conjugaison du premier Mixotope à l'Anatoxine Tétanique.

15 mg d'anatoxine tétanique sont dissouts dans 5 mL d'un mélange DMF:tampon phosphate 0,1M à pH 7,2 (25:75). 2,37 mg (11,25 µmoles) d'acide 6 maléimidocaproïque sont activés dans 1 mL de DMF, en présence de 5 mg de BOP (11,25µmoles) et de 6 µL (33,75 µmoles)

de DIEA à 0°C pendant 10 minutes. La solution d'ester d'HOBt de l'acide caproïque ainsi obtenu est ajouté à la solution de toxine. Le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante puis dialysé contre un tampon phosphate 0,1M à pH 7,2.

31 mg de Mixotope sont dissous dans 10 mL d'eau et 27 µL de tributylphosphine à 10% dans le méthanol (11,25 µmoles) sont ajoutés. Cette étape de réduction des cystines dure 30 minutes. On ajoute la solution dialysée d'anatoxine maléimidée immédiatement après. Ce mélange est ensuite agité pendant 24 heures à température ambiante puis dialysée contre un tampon phosphate 0,01M à pH 7,2 contenant 0,15M de chlorure de Sodium. Le nombre de molécules antigénique fixées par molécule de porteur macromoléculaire est déterminé par analyse d'acide aminé.

Glossaire

bibliothèque combinatoire : L'ensemble C de couples (a,b) résultant du produit cartésien de deux ensembles A et B de réactifs (de types a et b respectivement), représente les bibliothèques combinatoires faisables avec les réactifs de types a et b. Le nombre d'éléments de C est égal au produit du nombre d'éléments de A par le nombre d'éléments de B. Nous appelons les éléments de C des « *congénères* ».

charge : quantité de matière réactive rapportée à la masse de polymère mise en jeu (elle s'exprime souvent en mEq/g).

complexité : grandeur extensive caractérisant l'ensemble des structures chimiques d'une bibliothèque. Sa valeur est égale au nombre de structures chimiques que cette bibliothèque contient (voir diversité).

congénère : une bibliothèque combinatoire est formée de composés dits « *congénères* ».

DCR : Divide, Couple and Recombine. Il s'agit de l'abréviation du nom de la méthode de synthèse combinatoire en phase solide permettant d'obtenir une entité chimique unique sur un élément de support de synthèse (grain de résine par exemple). Cette méthode a été également appelée «Split».

DCR: Opposée à la méthode « mix », la méthode de synthèse « DCR » (utilisée le plus souvent en phase solide), implique qu'à chaque étape combinatoire, les variants sont incorporés indépendamment les uns des autres, dans des réacteurs séparés. Pour cela, le substrat de la réaction (molécule en croissance sur le polymère dans le cas de la synthèse en phase solide) est divisé en autant de sous-lots qu'il y a de variant à incorporer. Après la réaction, les substrats modifiés par chacun des variants sont remélangés et préparés pour l'étape suivante.

diversité : grandeur intensive caractérisant l'ensemble des structures chimiques présentes dans une bibliothèque. Cette grandeur est encore difficilement calculable avec les outils disponibles aujourd'hui pour caractériser un ensemble de composés chimiques. Néanmoins, elle est accessible expérimentalement par le biais de l'évaluation biologique de la bibliothèque (de chacun de ses composants) sur un récepteur donné, si l'on postule que le potentiel (de découverte d'une structure active sur un récepteur donné) d'une bibliothèque est proportionnel à la fois à sa complexité (grandeur intensive) et à sa diversité (grandeur intensive).

Edman (dégradation d') : méthode de dégradation récurrente des peptides à partir de l'extrémité aminoterminal.

Freund (Adjuvant de .) : les adjuvants sont des préparations destinées à être co-injectées avec des antigènes pour en renforcer la puissance immunogène. L'adjuvant complet de Freund contient des ... dans une matrice lipidique. Son action L'adjuvant incomplet, lui, n'est constitué que de la fraction lipidique du premier ; son effet est surtout cinétique.

HTS (High-Throughput-Screening) : stratégie de criblage systématique de composés mettant en œuvre des automates de laboratoire, utilisant de très faibles quantités de matériel chimique (quelques microgrammes par point) et ayant pour but d'attribuer des activités biologiques à des structures chimiques ou des mélanges de composés (naturels ou synthétiques). Les automates actuellement en service peuvent, à l'aide des méthodes classiques de mesures, réaliser jusqu'à 10,000 points expérimentaux par jour.

La phénylthiohydantoïne "PTH" dérivée de l'acide aminé en jeu à chaque étape de dégradation est analysée par chromatographie liquide et permet l'identification de l'acide aminé parent. La suite des PTH obtenus permet donc de déterminer la séquence du peptide. Les techniques modernes de séquençage selon Edman, mises en œuvre sur des automates performants permettent d'élucider une séquence d'une dizaine d'acides aminés sur quelques dizaines de picomoles.

Markush (formule de.) : formule générique d'un ensemble combinatoire de composés dans laquelle les groupements variables sont symbolisés par des Rⁿ. Sont associés à cette structure des tableaux donnant les valeurs possibles des groupements Rⁿ. Cette formule peut symboliser l'ensemble des congénères d'une bibliothèque combinatoire. La notation de Markush est employée principalement dans le domaine des brevets.

mix : opposée à la méthode « DCR », cette méthode implique le couplage simultané et en mélange des différents variants. Pour éviter l'incorporation préférentielle des variants aux cinétiques les plus favorables, différents auteurs ont proposé de ne pas utiliser d'excès de réactifs lors de ces couplages.

partition : Un ensemble de sous-ensembles (ou « parties ») d'un ensemble A constitue une partition de A si et seulement si les trois conditions suivantes sont réalisées : 1^{èrement} chacune de ces parties est non vide, 2^{ment} la réunion de ces parties est l'ensemble A, 3^{ment} deux parties non égales quelconques sont disjointes.

pharmacophore : dans un édifice moléculaire, le pharmacophore est constitué des pièces qui interagissent avec le récepteur biologique, disposées d'une manière définie dans l'espace. Sans ces éléments pharmacophoriques, la molécule est inactive ou peu active. Les éléments classiquement impliqués dans un pharmacophore sont les sites donneurs ou accepteurs de liaison hydrogène, les groupement aromatiques, pour les interaction directionnelles, et les atomes ou groupement chargés pour les interactions non directionnelles.

protéome : ensemble des protéines issues de l'expression du génome. La connaissance du protéome n'est pas redondante avec celle du génome car autant le génome est stable dans le temps, autant le protéome est polymorphe. En effet l'expression des protéines est étroitement liée au temps et à l'environnement. De plus, nombre de protéines ne sont pas le reflet fidèle de leur gène, car elles subissent une série de modifications post-traductionnelles qui en altèrent la structure et la fonction.

variant : élément d'un ensemble de réactifs contribuant à la diversité des structures des produits dans bibliothèque combinatoires (ex : un acide aminé pour une bibliothèque de peptides).

Abréviations :

Ala : Alanine
Arg : Arginine
Asn : Asparagine
Asp : acide aspartique
AVP : arginine Vasopressine
BOM : Benzyloxyméthyle
Bzl : benzyle
DCM : dichlorométhane
DCR : Divide Couple and Recombine
DMF : N, N diméthylformamide.
ELISA :
Eq : équivalent
Gln : Glutamine
Glu : Acide Glutamique
Gly : Glycine
His : Histidine
HBTU : 2-(1H-Benzotrizole-1-yl)1-,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HPLC : High Pressure Liquide Chromatography
Ign : Isoglutamine
Igu : Acide isoglutamique (élongation de la chaîne peptidique par le carboxyle latéral)
Ile : Isoleucine
Ipe : Acide isonipécotique
Leu : Leucine
Lys : Lysine
Mto : Méthionine S-sulfoxyde
Nyc : ϵ -nicotinoyllysine
OBzl : ester benzylique
OtBu : ester terbutylique
Phe : Phénylalanine
Pnp : 3-(4'-nitrophényl) alanine
PTH : phénylthiohydantoïne
Ser : Sérine
tBoc : tertiobutyloxycarbonyl
tBu : éther tertiobutylique
TFA : acide trifluoroacétique
Thr : thréonine
Tic : Acide tétrahydroquinoléinecarboxylique
Tos : Tosyle = paratoluènesulfonyle
Trp : Tryptophane
Val : Valine
VIH : virus d'immunodéficience humain

Z : de Zervas, = CBZ : Benzyloxycarbonyle

¹ on peut citer les problèmes posés par le taxol et ses dérivés.

² Lam KS, Salmon SE, Hersch EM, Hraby, VJ, Kazmierski WM, Knapp RJ, *Nature*, **1991** 91 p10779-10785.

³ Edman

⁴ RMN sur 1 bille

⁵ Pop IE, Dhalluin C, Déprez B, Melnyk P, Lippens G, and Tartar A. *Tetrahedron*, **1996**, vol 52, 37, p 12209-12222.

⁶ Janda KD, *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **1994**, 91 p10779-10785

⁷ Pirrung MC, Chen J, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, p1240-1245.

⁸ Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D, *Science*, **1991**, 251, p767-773.

⁹ Houghten RA, Pinilla C, Blondelle S, Appel RJ, Dooley CT, Cuervo JH, *Nature* **1991**, 354, p84-86.

¹⁰ Wyatt JR, Vickers TA, Robertson JL, Buckheit RW, Klimkeit T, deBaets E, Davies PW, Rayber B, Imbach JL, and Ecker DJ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991** 91 1356-1360

¹¹ Ecker DJ, Vickers TA, Hanecak, R Driver V, and Anderson K, *Nuc. Acid. Res.* 21 1853-1856

¹² Houghten RA, Pinilla C, Blondelle SE, Appel JR, Dooley CT, Cuervo JH. *Nature*, **1991**, 354 p84-86

¹³ Blondelle SE, Takahashi E, Weber PA, and Houghten RA, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 p2280-2286

¹⁴ Owens RA, Gesellshen PD, Houcins BJ, Di Marchi RD *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991 181 p401-402.

¹⁵ Houghten RA, Appel JR, Blondelle SE, Cuervo JH, Dooley CT, and Pinilla C. **1992**, *BioTechniques* 13, p412-421

¹⁶ Terrett NK, Bojanic D, Brown D, Bungay PJ, Gardner M, Gordon DW, Mayers C, and Steele J *Bioorg Med. Chem. Let.* **1995**, 5 p917-922.

¹⁷ Neustadt B, Wu A, Smith EM, Nachuta T, Fawzi T, Zhang H, Ganguly AK, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1995, 5 p2041-5044.

¹⁸ Koppel G, Dodds C, Houchins B, Hunden D, Johnson D, Owens R, Chaney M, Usdin T, Hoffman B, Brownstein M, *Chemistry and Biology* **1995**, 2, p483-487.

¹⁹ Pirrung MC, Chen J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995** 117 p1240-1245.

²⁰ Freier SM, Konings DA, Wyatt JR, Ecker DJ, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, p344-352

²¹ Erb E, Janda KD, Brenner S, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, p11422-11426.

²² Pinilla C, Appel RJ, Blondelle S, Dooley CT, Eichler J, Ostreh JM, Houghten RA, *Drug Development Research*, **1994**, 33, p133-145.

²³ Dooley CT, Houghten RA, *Life Science* **1993**, 52, p1509-1517.

²⁴ Pirrung MC, Chen J, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, p1240-1245.

²⁵ Dooley CT, Houghten RA, *Life Sci.*, **1993**, 52 p1509-1517.

²⁶ Furka, *International Symposium on Perspectives and Innovations in Solid Phase Chemistry and Combinatorial Chemistry*, Edimbourg **1995**

²⁷ calcul de la redondance des méthodes de déconvolution :

$$1/ \text{Déconvolution itérative} : \frac{\frac{N}{n} + \frac{N}{n^2} + \frac{N}{n^3} + \dots + \frac{N}{n^{N-1}}}{N} = 1 + \sum_{i=1}^{N-1} \frac{1}{n^i}$$

2/ Scanning positionnel : $NN/N = N$

3/ Bibliothèques orthogonales : $\frac{N+N}{N} = 2$

(avec N = complexité de la bibliothèque totale, n = nombre de variants à chaque étape combinatoire et N = nombre d'étapes combinatoire)

²⁸ Merrifield RB, The Synthesis Of A Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**,

²⁹ Bodansky M, Martinez J, **1981**,

³⁰ Heath WF, Tam JP, Merrifield RB, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982** p 897.

Tam JP, Heath WF, Merrifield RB, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 21, **1983**, p57-65.

³¹ Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI, *Analytical Biochemistry*, **1970**, 34, 2

Troll W, Cannan, RK, *J. Biol. Chem.*, **1953**, 200, p803

³² Christensen K, *Acta Chemica Scandinavica B*, **1970**, p763-766

³³ Merrifield RB *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85 2149-2154.

Gutte B, Merrifield Rbn *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 1922-1941

Yamashiro D, Li CH, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, p 5174-5179

³⁴ nomenclature IUPHAR

³⁵ Travaux de Hibert 7TM

³⁶ Dubocovich, ML, *Trends in Pharmacol. Sci* **1995** 16 n°2 p50

³⁷ B. Kosko, *Fuzzy Thinking*, Hyperion, New-York, **1993**

³⁸ R. Spencer (Pfizer Central Reserch) *Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry Meeting*, San Diego, 1996.

³⁹ -Terrett, N. K., M. Gardner, et al.. **1995**. *Tetrahedron* 51: p8135-8173.

- Gallop, M. A., R. W. Barrett, et al. **1994**. *Journal of Medicinal Chemistry* 37: p1233-1251.

-Hobbs DeWitt S. Czarnik AW, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, p114-122

-Armstrong RW, Combs AP, Tempest PA, Brown SD, Keating TA, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, p123-132.

-Gordon EM, Gallop MA, Patel DV, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, p144-154

⁴⁰ -Goff DA, Zuckermann, RN, *J. Org. Chem.* **1995**, 60. p5748-5749

-Hiroshige M, Hauske JR, Fhou P, *Tetrahedron Let.* **1995** 36 4567-4570

⁴¹ Rano TA, Chapman KT, *Tetrahedron Let.* **1995** 52, 993-1004

⁴² Hutchins SM, Chapman KT, *Tetrahedron Let.* **1996**, Vol 37, 28, p4869-4872.

-
- ⁴³ Kaldor SW, Siegel MG, Tritz JE, Dressman BA, Hahn PJ, *Tetrahedron Let.* **1996**, Vol 37 , 40, p7193-7196.
- ⁴⁴ Tam, J. P., D. N. Posnett, et al. **1988**, *Journal of Biological Chemistry* 263: 1719-1725.
- Tam, J. P. **1988**. *Proceeding of the National Academy of Science* 85: 5409-5413.
- ⁴⁵ LaRosa G, Davide, Weinhold K, Waterbury J, Profy A, Lewis J, Langlois A, Dreesman G, Neal R, Bobswell RN, Shaddock P, Holley L, Karplus M, Bolognesi D, Matthews T, Emini E, Putney S. *Science*, **1990** 249, p932-935.
- Putney S, LaRosa G, Matthews T, Emini EA, Bobswell RN, Bolognesi D, and Weinhold K. In Girard M and Valette L, Quatrième Colloque des Cents gardes, Pasteur Vaccins, p 189-193.
- ⁴⁶ Neurath, AR, Strick N, *Mol.Immunol.*, **1990**, 27, p539-549
- ⁴⁷ Ostresh, J. M., J. H. Winkle, et al. **1994**. *Biopolymers* 34: 1681-1689.
- ⁴⁸ Boutin JA, Fauchère A L, *Trends in Pharmacological Sciences*, **1996** 17, p8-12
- ⁴⁹ Geysen H, Mason TJ, Rodda SJ, *Journal of Molecular recognition*, **1988**, 1, p32-41
- ⁵⁰ Gausepohl et al, *European Peptide Symposium*, **1992** Interlaken, Switzerland.
- ⁵¹ Sarin VK, Kent SBH, Tam JP, Merrifield RB, *Analytical Biochem.*, **1981** 117, p147-157
- ⁵² Tam, J. P., W. F. Heath, et al. **1983**. "SN2 Deprotection of Synthetic Peptides with a Low Concentration of HF in Dimethyl Sulfide : Evidence and Application in Peptide Synthesis." *Journal of American Chemical Society* 105, p6442-6455.

IMMUNIZATION OF MICE WITH LIPOPEPTIDES BYPASSES THE PREREQUISITE FOR ADJUVANT

Immune Response of BALB/c Mice to Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein

FREDERIC MARTINON,^{1,2,*} HELENE GRAS-MASSE,[†] CHRISTOPHE BOUTILLON,[†]
FREDERIC CHIRAT,[†] BENOIT DEPREZ,[†] JEAN-GERARD GUILLET,^{*} ELISABETH GOMARD,^{*}
ANDRE TARTAR,[†] AND JEAN-PAUL LEVY^{*}

From the ^{*}Laboratoire d'Immunologie et d'Oncologie des Maladies Rétrovirales, INSERM U152, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 27 rue du Fbg. Saint-Jacques, 75014 Paris; and [†]Université de Lille II, URA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille cédex, France

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-2D^d-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.

Generation of CTL is a critical component of the immune response to intracellular pathogens. This is best documented for viral infections, where CTL are specifically induced by intracellularly synthesized Ag that are processed as peptides that associate with MHC class I molecules before presentation on the cell surface. Consequently, in vivo induction of the CTL response is best

achieved by priming with replicating virus (1) that is not suitable for vaccine application. Immunization with inactivated virus as well as exogenous proteins is usually ineffective for in vivo induction of MHC class I-restricted CTL, although such Ag preparations may induce MHC class II-restricted Th cells and antibody-mediated responses. However, such CTL have recently been obtained by using purified proteins in immunostimulating complexes (2, 3), or reconstituted in liposomes (4).

In vivo induction of CTL by peptide immunization was first documented in the OVA system (5, 6). Research involving this literature has triggered potential peptide vaccines against viruses. Investigators have claimed that short synthetic peptides prime virus-specific CTL provided the peptides are mixed in lipophilic adjuvant (CFA or IFA) (7-11). Alternatively, modification of synthetic peptides derived from influenza virus nucleoprotein by linkage to the P3CSS³ lipopeptide component of *Escherichia coli* has been described as a possibility for stimulating CTL responses in vivo (12-14).

In this context, we decided to evaluate the immunogenic properties of peptides modified by a simple lipidic construct, Hda, possessing a simple 14 carbon, linear saturated aliphatic side chain. We introduced this lipidic amino acid at the carboxyl-terminal end or at both ends of peptides containing a known MHC class I-restricted epitope. These lipopeptides were compared to their peptide analogs for their capacity to induce in vivo Th cell-, CTL- or antibody-mediated responses in H-2^d mice. We investigated the influence of the size of the peptide sequence and the requirement for adjuvant. With this aim, we selected two peptides from the HIV-1/BRU envelope glycoprotein gp160. The first peptide, corresponding to sequence 312-327 (designated as V3S), is recognized by CTL (15) as well as by Th cells (16). The second peptide corresponds to sequence 302-335 (here after designated as V3L); it includes the previous peptide and contains an additional Th cell epitope within position 302-312 (A.

Received for publication May 28, 1992.

Accepted for publication August 27, 1992.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by a grant from the Agence Nationale de Recherche sur le Sida.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Frederic Martinon, INSERM U152, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

³ Abbreviations used in this paper: P3CSS, tripalmitoyl-S-glycerylcyteineyl-seryl-serine; Hda, α -aminohexadecanoic acid; V3S peptide, peptide corresponding to sequence (312-327) from gp120 of HIV-1/BRU; V3L peptide, peptide corresponding to sequence (302-335) from gp120 of HIV-1/BRU; Vac-*env*, vaccinia virus recombinant for the *env* gene of HIV-1/BRU; Vac-*gag*, vaccinia virus recombinant for the *gag* gene of HIV-1/BRU.

Szabo, personal communication) as well as a sequence recognized by HIV-1-neutralizing antibodies (17). We used our system to show that priming with lipopeptides bypassed the requirement for adjuvant in T and B cell stimulation.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of N-tert-butyloxycarbonyl α -amino hexadecanoic acid. Hda [$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}((\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3)\text{COOH}]$] was obtained by nucleophilic substitution of a bromo hexadecanoic acid by ammonia. The N- α -tert-butyloxycarbonyl group was introduced by action of the tert-butylidicarbonate on the Hda. All reagents were from Aldrich-Chimie (Strasbourg, France). Further details of this synthesis will be published elsewhere.

Peptide synthesis. The peptides were synthesized using the conventional solid-phase "Boc-benzyl strategy" (18) in an automated Applied Biosystem 470A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Tert-butyloxycarbonyl protected amino acids were purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan). Side chain protections were as follows: arginine (tosyl), cysteine (S-paranethylbenzyl), histidine (N^ε-2-dinitrophenyl), lysine (N^ε-2-chlorobenzyloxycarbonyl), tryptophan (formyl), and tyrosine (2,6-dichloro-benzyl ether). Resins for solid phase synthesis were from Applied Biosystem. Unmodified peptides were synthesized on "Pam" (19) resins, and obtained after hydrogen fluoride cleavage from the resin with a carboxylic carboxyl-terminal end, whereas modified peptides were synthesized on methylbenzhydrylamine resins and obtained with a carboxamide carboxyl-terminal end. When a second Hda was introduced, the N-terminal group was deprotected by using 0% trifluoroacetic acid, neutralized and acetylated by acetic anhydride. After hydrogen fluoride final deprotection and cleavage from the resin in a Teflon-Kel F apparatus (Asti, Courbevoie, France), the peptides were purified by two consecutive trifluoroacetic acid/ether precipitations, followed by reversed-phase preparative HPLC, performed on Vydac C4 7 μ 300 Å column (4.5 \times 250 mm), with an acetonitrile-water-0.1% trifluoroacetic acid solvent system, using a 0-min gradient from 12 to 60% acetonitrile. Peptides were characterized by amino acid analysis after total acid hydrolysis. The amino acid sequences of peptides were as follows: V3S peptide, I-R-I-Q-R-P-G-R-A-F-V-T-I-G-K; V3L peptide, T-R-P-N-N-N-T-R-K-S-I-R-I-Q-G-P-G-R-A-F-V-T-I-G-K-I-G-N-M-R-Q-A-H-C. As the lipidic amino acid could not be observed using this method, we were able to confirm its incorporation into V3S-Hda lipopeptide by molecular mass determination. The expected molecular mass was observed: V3S-Hda, (M + H)⁺ = 2024 (determined by plasma desorption mass spectrometry). As V3L-Hda lipopeptide was obtained by N-terminal elongation of the same peptidyl-resin as the short analog V3S-Hda, it was assumed that incorporation of the carboxyl-terminal Hda was ineffective. Incorporation of the N-terminal Hda was monitored using the qualitative ninhydrine test.

Unmodified V3S and V3L peptides as well as Hda-modified V3L peptides were water soluble (>1 mg/ml). V3S-Hda and Hda-V3S-Hda peptides yielded turbid suspensions. After filtration of \approx 0.6 mg/ml solutions on a 0.22- μ m filter, the solubilized fractions were as follows: peptide V3S-Hda, 0.46 mg/ml (77%) and peptide Hda-V3S-Hda, 0.07 mg/ml (12%). These solutions or suspensions were not filtered before in vivo priming of animals.

Viruses. Vac-env (20) and Vac-gag (21) were purchased from Transgene (Strasbourg, France) and generously provided by the Centre Nationale de Recherche sur le Sida.

Priming of mice and CTL stimulation. BALB/c mice (H2^d) were primed i.p. with 50 nmol of free peptide or lipopeptide in PBS, or i.v. with 10⁷ PFU of Vac-env. Then 3 wk later, mice were boosted under identical conditions. Fifteen days after the last injection, spleens were removed for in vitro lymphocyte stimulation. Splenocytes from naive or primed mice were cultured in 24-well plates at 5 \times 10⁶ cells/well in 2 ml DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2.5 μ g/ml amphotericin B, 50 mM 2-ME, and 10% heat-inactivated FCS (Flow Laboratories, Irvine, Scotland) (culture medium), and containing 3 to 5 μ M synthetic peptide. Additional in vitro restimulations were performed weekly by mixing 5 \times 10⁵ effector cells with 5 \times 10⁵ irradiated (4000 rad) syngeneic spleen cells in 2 ml/well of culture medium containing synthetic peptide and supplemented with 5% of IL-2-containing supernatant prepared as previously described (22).

Cytotoxicity assays. Virus-infected target cells were obtained by 90 min incubation at 37°C with 10 plaque-forming units/cell of recombinant vaccinia virus and used as targets 18 h later as already described (23). Uninfected or infected P815 (H-2^d, DBA/2) or EL4 (H-

2^b, C57BL/6) cells (1–2 \times 10⁶ in 200 μ l culture medium) were labeled with 100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ (CEA, Gif sur Yvette, France) for 1 h at 37°C. After two washings, 3000 labeled targets and serial dilutions of effector cells were incubated in 200 μ l of culture medium in round-bottomed microtiter plates. Synthetic peptides were included in the appropriate assays at 3 μ M. The cytotoxicity assay was terminated after a 4-h incubation at 37°C, and 100 μ l of supernatant were harvested and specific lysis was determined as: % specific lysis = 100 \times (experimental – spontaneous release)/(total ⁵¹Cr incorporated – spontaneous release). In all experiments, spontaneous release in the absence of effector cells was <20% of maximum release.

Lymph node cell proliferation. Mice were immunized s.c. with 50 nmol of the appropriate peptide or lipopeptide in saline or in CFA (Difco Laboratories, Detroit, IL) and 10 days later draining lymph nodes were removed. The 5 to 8 \times 10⁵ lymph node cells were cultured in 200 μ l DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 50 μ M 2-ME, and 1% Nutridoma-SP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) in round-bottomed microtiter plates with the indicated concentration of peptide or lipopeptide for 72 h: 8 to 10 h before harvesting, 1 μ Ci/well of [³H]TdR was added. Cells were harvested and [³H]TdR incorporation was measured by scintillation counting.

Immunization for antibody production. BALB/c mice were i.p. immunized on day 0 with 30 nmol in 100 μ l of unmodified or Hda-modified V3L peptides. On days 13, 23, and 35, animals were boosted with 15 nmol of appropriate peptide or lipopeptide, and bled on days 0, 13, and 47. Mice were immunized and boosted with V3L peptide or V3L-Hda lipopeptide in saline or with V3L-Hda lipopeptide in CFA and boosted in IFA as indicated in the legend to Figure 6. Sera were collected on day 13 after the first immunization and 12 days after the third boost, and were then pooled and tested by ELISA on the unmodified V3L peptide as solid phase Ag.

Immuno enzymatic assay (ELISA). The 96-well plates were incubated overnight at room temperature with 200 μ l of a 10 μ g/ml solution of the unmodified V3L peptide in a 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6, and blocked afterward with 300 μ l of a 2% Ultrasor HY solution for cell culture (IBF, LKB, Villeneuve-la-Garenne, France) in 1.8% NaCl, 0.01 M PBS, pH 7.2, for 1 h at room temperature. After washing (1.8% NaCl, 0.01 M PBS, pH 7.2, 0.1% Tween-20), dilutions of sera, in 2% Ultrasor HY, 1.8% NaCl, 0.01 M PBS, pH 7.2, were incubated in coated wells for 2 h at 37°C. After multiple washings, 200 μ l 1/10,000 goat-anti-mice IgG or IgM peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were added for 2 h at 37°C. After additional washings, a substrate solution (citrate buffer, H₂O₂, ortho-phenylenediamine dihydrochloride) was added. After 30 min incubation protected from light at room temperature, the reaction was stopped by using 100 μ l H₂SO₄ 4 N. Absorbance was recorded at 492 nm.

RESULTS

CTL activity of unprimed or virus-primed mice. Studies have reported that CTL can be generated by primary in vitro stimulations with peptides (24, 25). We therefore began by assessing the ability of V3S peptide to induce CTL in vitro from unprimed mouse splenocytes. Under these conditions, V3S peptide effectively elicited peptide-specific CTL responses (Fig. 1). Nevertheless, in our investigations, the cytolytic activity of these T cells was never detected before the 18th day of in vitro culture, i.e., after three in vitro restimulations (Fig. 1, A and B). Identical results were obtained using V3L peptide (not shown). Furthermore, as already described (14, 24, 26), these in vitro peptide-primed CTL were incapable of lysing endogenously expressing antigen target cells, i.e., cells infected by Vac-env. In contrast, Vac-env-primed mice generated early detectable CTL in vitro which were able to lyse virus-infected targets (Fig. 1, C and D). The weak lysis of cells infected with Vac-gag (Fig. 1C) might correspond to the activity of CTL specific for vaccinia virus proteins. In view of these results, we evaluated the efficiency of in vivo priming according to both criteria: i.e., the delay before detection of cytolytic activity and the ability of CTL to lyse virus-infected target cells.

In vivo priming of CTL with synthetic constructs. The

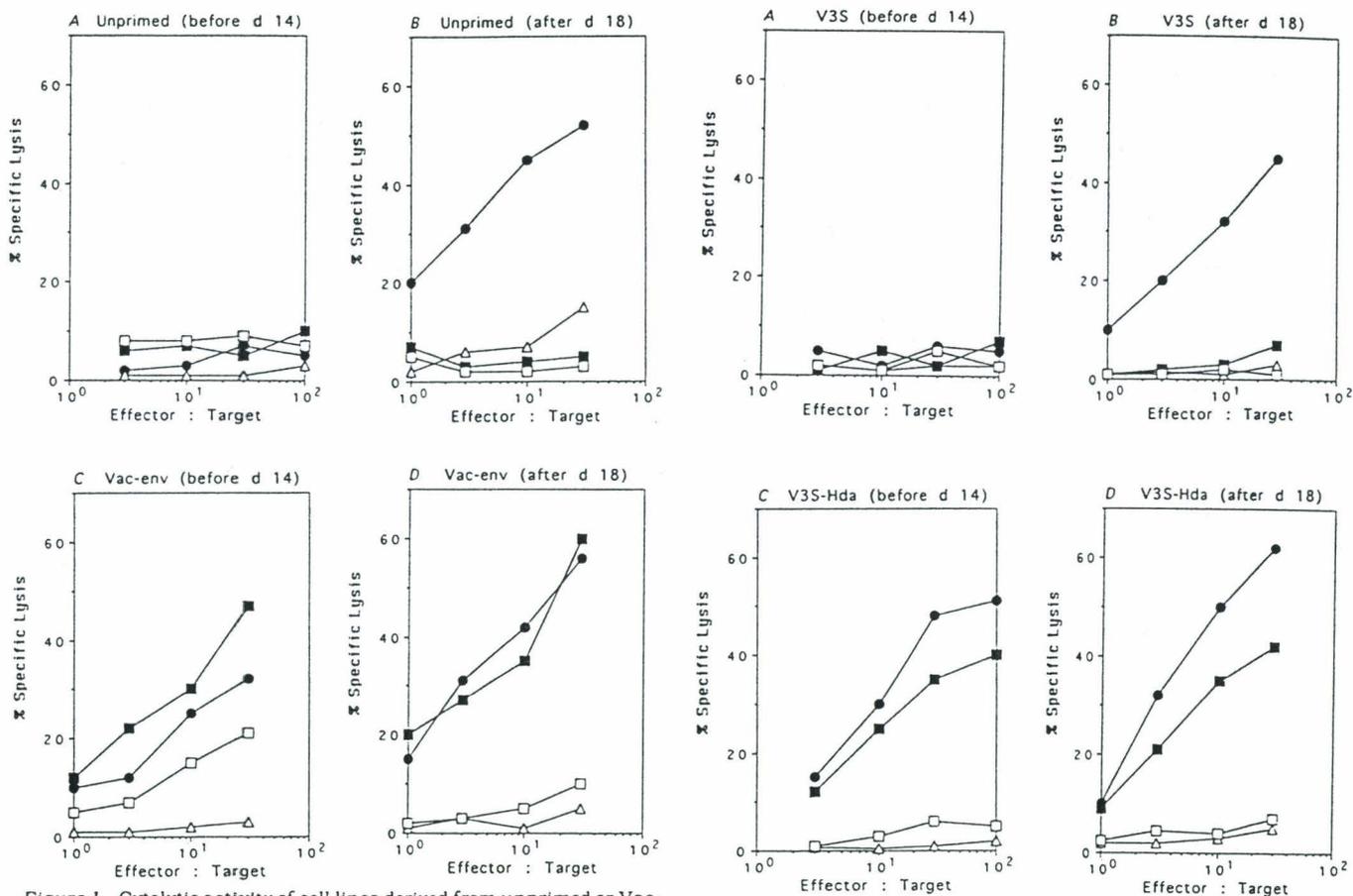


Figure 1. Cytolytic activity of cell lines derived from unprimed or *Vac-env*-primed BALB/c. Five days after *in vitro* stimulation with V3S peptide cell lines derived from splenocytes of naive (A and B) or *Vac-env*-primed (C and D) BALB/c mice were tested for their capacity to lyse P815 target cells infected with *Vac-env* (■), with the control virus *Vac-gag* (□), sensitized with V3S synthetic peptide (●) or in the presence of culture medium alone (△). Experiments were performed before (A and C) and after (B and D) the third *in vitro* restimulation.

capacity of V3S peptide and its lipopeptide analogs V3S-Hda and Hda-V3S-Hda to induce peptide- and virus-specific CTL responses *in vivo* was evaluated in BALB/c mice. The unmodified V3S peptide, which could sensitize P815 cells for lysis by *Vac-env*-primed CTL, was incapable of priming the CTL response when injected in saline into mice (Fig. 2, A and B). Indeed, the cytolytic activity of these cell lines was no different from that of control cell lines derived from unprimed mice (Fig. 1), because it was detected after the third *in vitro* restimulation, and with peptide presenting targets only. In comparison, the V3S-Hda lipopeptide in saline strongly induced CTL that were detectable at an early stage and were able to lyse peptide-coated and virus-infected target cells (Fig. 2, C and D). In this model, the Hda-V3S-Hda lipopeptide analog, i.e., modified at both ends by the lipidic amino acid, also induced virus-specific CTL, but that were observed after a longer cell-culture latency (Fig. 2, E and F). Nevertheless, these CTL were able to lyse virus-infected targets (Fig. 2F) and consequently were clearly different from those derived from naive and peptide-primed mice.

To assess the importance of the size of the peptide sequence and the proximity of the lipidic group, the V3L peptide (34 amino acids) and its analogs were also tested (Fig. 3). Once again, priming with V3L-Hda elicited strong detectable peptide- and virus-specific CTL responses

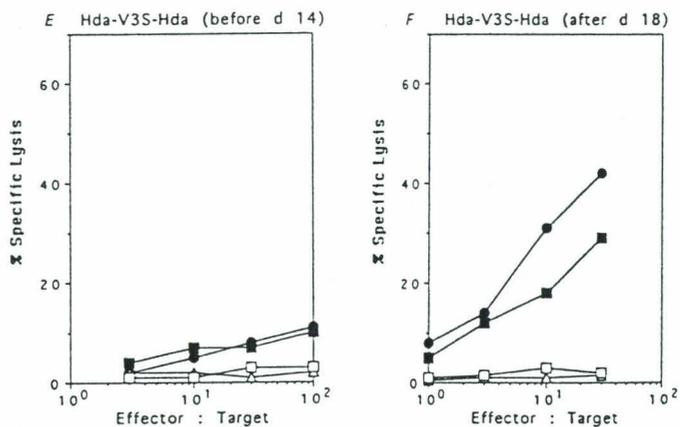


Figure 2. Cytolytic activity of cell lines derived from BALB/c primed with V3S constructs. Cell lines derived from BALB/c primed *in vivo* with V3S synthetic peptide (A and B) or with V3S-Hda (C and D) or Hda-V3S-Hda (E and F) lipopeptides were tested for their capacity to lyse P815 target cells infected with *Vac-env* (■) or *Vac-gag* (□), sensitized by V3S synthetic peptide (●) or in the presence of culture medium alone (△) before (A, C, and E) and after (B, D, and F) the third *in vitro* restimulation.

early on (Fig. 3, C and D), whereas priming with the unmodified V3L peptide did not (Fig. 3, A and B). Lipopeptide obtained by modifying both ends of this long sequence (Hda-V3L-Hda) showed the same efficiency as the V3L-Hda lipopeptide in terms of priming CTL (Fig. 3, E and F). Identical results were obtained by *in vitro* restimulating these cell lines either with V3L or V3S peptide (not shown).

All CTL lines obtained were class I MHC restricted, because they did not lyse allogeneic EL4 (H-2^b, C57BL/6) target cells in contrast to histocompatible P815 (H-2^d,

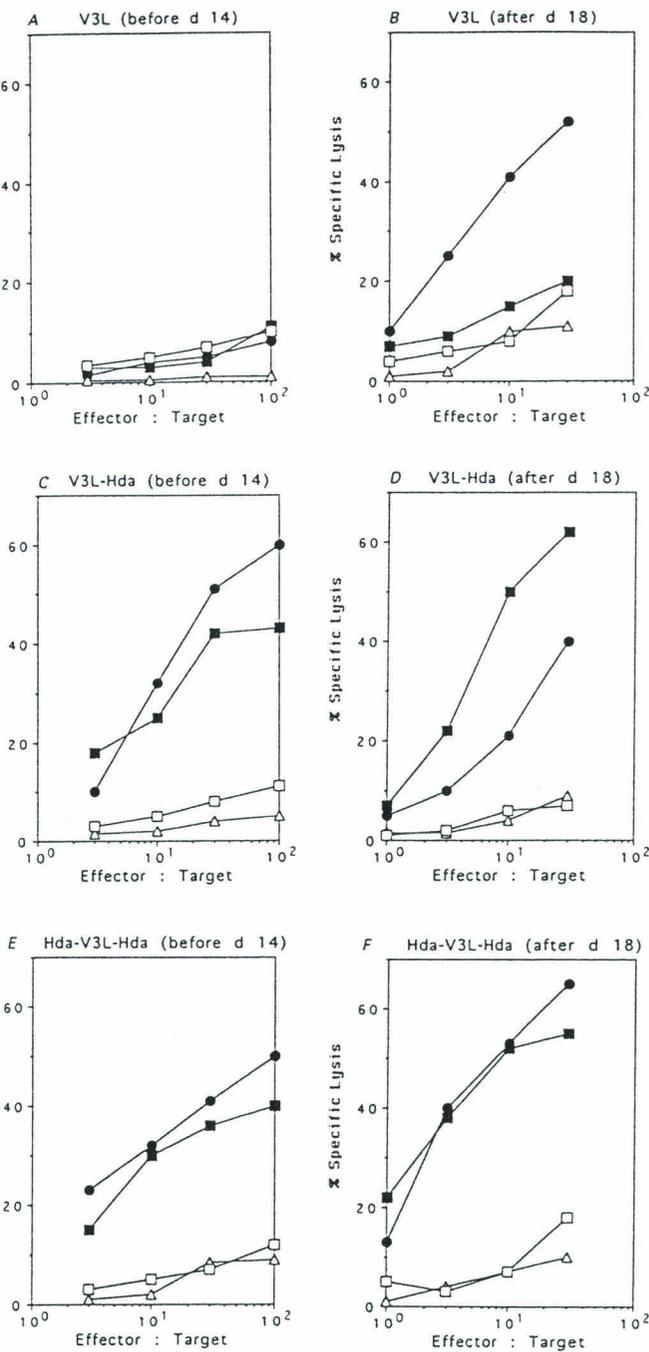


Figure 3. Cytolytic activity of cell lines derived from BALB/c primed with V3L constructs. Cell lines derived from BALB/c primed in vivo with L synthetic peptide (A and B) or with V3L-Hda (C and D) or Hda-V3L-Hda (E and F) lipopeptides were tested for their capacity to lyse P815 target cells infected with Vac-*env* (■) or Vac-*gag* (□), sensitized by V3S synthetic peptide (●) or in the presence of culture medium alone (△) before (C, and E) and after (B, D, and F) the third in vitro restimulation.

BA/2) cells (not shown). Neither of these target cell lines expressed class II MHC molecules. In addition, the CTLs obtained in this work were sensitive to treatment with anti-CD8 plus complement, whereas treatment with anti-CD4 had no effect (not shown). Thus, effector cells induced by our lipopeptides in vivo were classical MHC class I-restricted CD8⁺ CTL.

Th cell responses to peptides and lipopeptides. Th cells are involved in induction of CTL (27). We therefore compared the stimulation of Th cells induced either by peptides or by lipopeptides. Figure 4 shows that V3S peptide induced Th cell proliferation only when injected

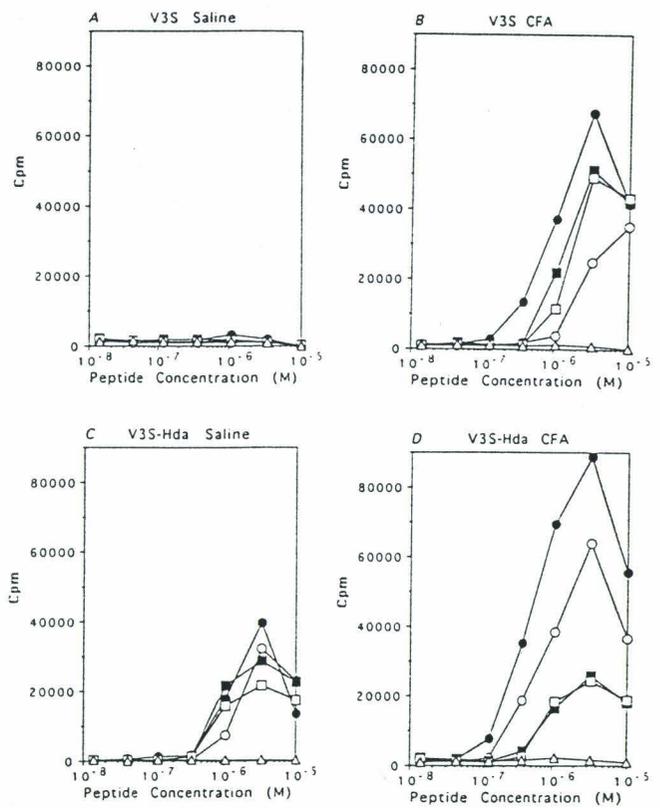


Figure 4. Lymph node T cell proliferation induced with V3S peptide or V3S-Hda lipopeptide. Proliferation of lymph node T cells from V3S peptide (A and B) or V3S-Hda lipopeptide (C and D) primed BALB/c were tested in the presence of V3S peptide (●), V3S-Hda lipopeptide (○), V3L peptide (■), V3L-Hda lipopeptide (□), or cl. 12-26 irrelevant I-A^b-restricted peptide (△).

into CFA, but not into saline. By contrast, V3S-Hda lipopeptide did not require the presence of adjuvant: although the best response was induced by priming in CFA, V3S-Hda lipopeptide in saline elicited a significant Th cell response. Similar results issued from the comparison of priming with V3L peptide and V3L-Hda lipopeptide (Fig. 5). Interestingly, V3S-primed Th cells recognized both V3S and V3L peptides, whereas V3L-primed Th cells recognized V3L peptide, but not V3S peptide, suggesting that the epitope included in the 302-312 sequence is immunodominant over the epitope included in the 312-327 sequence.

Antibody response to V3L-derived constructs. In contrast to V3S peptide, V3L peptide also contains a known epitope for antibodies to the HIV-1 envelope glycoprotein. We were therefore interested in an evaluation of the antibody responses generated after immunization of BALB/c mice with the V3L peptide and its analogs. Figure 6 shows that V3L-Hda lipopeptide injected into saline induced IgG production, whereas V3L peptide did not. The response induced with V3L-Hda lipopeptide was lower when injected into CFA than into saline. Nevertheless, using squalen as adjuvant, the resulting response was greater (not shown), indicating that the absence of adjuvant mixed with V3L-Hda lipopeptide did not always increase its immunogenicity toward B cells.

DISCUSSION

Modification of lipophilic properties is a conventional manipulation of peptidic structures involved in medical

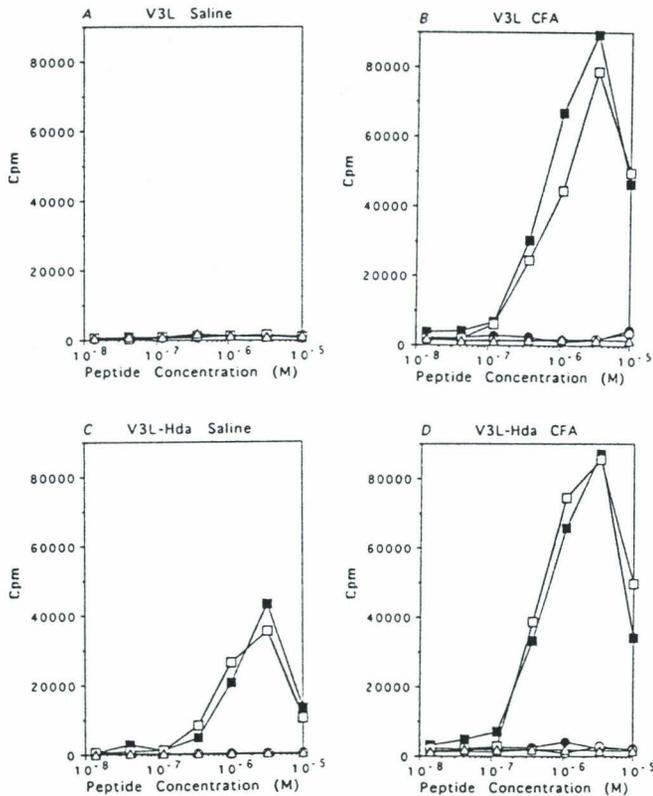


Figure 5. Lymph node T-cell proliferation induced with V3L peptide or V3L-Hda lipopeptide. Proliferation of lymph node T cells from V3L peptide (A and B) or V3L-Hda lipopeptide- (C and D) primed BALB/c were tested in the presence of V3S peptide (●), V3S-Hda lipopeptide (○), V3L peptide (■), V3L-Hda lipopeptide (□), or cl. 12–26 irrelevant peptide (Δ).

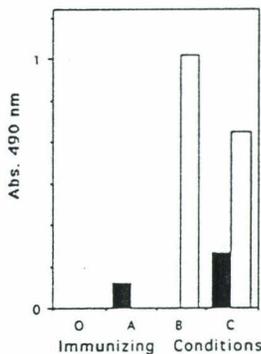


Figure 6. Antibody responses to V3L peptide and its V3L-Hda lipopeptide analog. IgM (black bars) and IgG (white bars) in mice sera were measured by ELISA after different immunizing conditions: unimmunized control animals (O); V3L peptide in saline (A); V3L-Hda lipopeptide in saline (B); V3L-Hda lipopeptide in CFA (C). Shown are results of duplicates at a serum dilution of 1/512.

chemistry: introduction of lipidic amino acids with long hydrocarbon side chains has been proposed to improve membrane association and activity of peptidic elastase inhibitors (28) or to improve the bioavailability of GABA (29). In the field of synthetic vaccines, this approach has also been used: introduction of fatty acids in the N-terminal position has been shown to enhance antibody production by synthetic peptides emulsified in CFA (30), when associated with proteosome (31) or hepatitis B virus surface antigen (32). Covalent surface association with liposomes has been described as an efficient means of stimulating the T cell response (33). Triple associations (peptide-adjuvant-liposome) as an efficient Ag delivery system have recently been described (34). However, the

possibility of inducing a virus-specific cytotoxic response by using a chemically defined association between a peptide and a lipopeptidic adjuvant was a major breakthrough in the field. Whereas in the previous examples, modification of the lipophilicity of peptides yields improvement in the immunogenic properties of free peptides, the modification proposed by Rammensee's group (12–14) confers upon peptides the capacity to prime CTL *in vivo*.

To investigate the capacity of peptides covalently linked to a simple lipidic chain to prime CTL, we selected from the HIV-1 envelope protein, two peptides of 16 and 34 amino acids containing known H-2^d-restricted epitopes recognized by Th cells and/or CTL. The lipidic amino acid Hda, introducible at any position in the peptide, was introduced in the carboxyl-terminal position or at both ends of each peptide. The relatively limited lipophilicity of the resulting lipopeptides led to water soluble constructs. In both cases, carboxyl-terminal modification of the peptide by a single Hda-primed CTL *in vivo*. The CTL responses generated by priming with the lipopeptides were clearly different from those induced using naive or peptide-primed mice, in terms of the delay before appearance and the ability to lyse target cells endogenously expressing the natural Ag. The physiologic relevance of lipopeptide-primed CTL was confirmed by comparison with virus-primed CTL in terms of intensity, specificity, and precocity. This physiological relevance was also reported by Schild et al. (14) in an influenza virus model, indicating that our results are not unique to the HIV-1 envelope CTL response. This is of particular interest in synthetic vaccine development, because it shows that lipopeptides are capable of inducing CTL to native viral proteins.

Introduction of a second fatty amino acid at the N-terminal end resulted in a less active construct for priming CTL in the case of the short V3S peptide (16 amino acid peptide), whereas priming with its lengthened homolog (34 amino acid peptide) provided activity comparable to that obtained with the single fatty acid construct. In addition, using an 11 amino acid peptide from the nucleoprotein of influenza virus, the double Hda-modified lipopeptide was inactive. In contrast to the single fatty acid homolog (not shown). These results suggest that a certain balance between the lipophilic and hydrophilic moieties must be maintained. An explanation for this weak activity of short double Hda-modified lipopeptides could lie in the proximity of the lipidic group to the epitope, causing steric hindrance or over protection from proteolytic processing. A more extensive study using various fatty amino acids introduced either at the N-terminal or carboxyl-terminal extremity suggests that the capacity for inducing CTL *in vivo* is dependent on the nature of the lipidic chain, but not on the N- or carboxyl-terminal position of a lipidic chain in the lipopeptide (H. Grasmann, et al., manuscript in preparation).

In addition to their ability to induce CTL, we showed that lipopeptides were also able to induce Th cell stimulation, required both for CTL generation and for antibody production. These results demonstrate that the use of lipopeptides can be applied successfully to induce both T and B cell responses. Furthermore, the priming efficacy of 34 amino acid lipopeptides suggests the possible use of large peptides containing several epitopes (B and T cell

epitopes) and perhaps viral protein regions containing multiple T cell epitopes presented by different MHC molecules, as recently described for HIV-1 Nef protein (35). This is of particular interest for a human vaccine, because the use of such regions might partially resolve the problem of MHC restriction involved in T cell responses.

It is noteworthy that, in contrast to that of peptides, immunization with lipopeptides did not require additional adjuvant to induce T cell or B cell responses. This capacity is once again of particular interest for human vaccination. Deres et al. (12) have advanced several hypotheses concerning the mechanism of *in vivo* priming using their lipotriptide P3CSS as the peptide anchor. In contrast to our simple constructs, their lipopeptide has a mitogenic effect on certain cells, and they suggest that this property could be responsible for the efficacy of *in vivo* priming. In addition, these authors have shown, in more recent work, that priming with their lipopeptide requires covalent linkage between peptide and lipophilic anchor (13). Certainly, accessory cell activation by lipidic components cannot be the only reason for the priming efficiency of lipopeptides. Other possibilities may be linked to the probable affinity of lipidic chains for cell membranes: lipids could act as peptide vehicles, introducing them into the Ag presentation pathway(s) either 1) by targeting the peptide to the cell surface or 2) by crossing the cell membrane(s). In the first hypothesis, direct binding with class I molecules at the cell surface cannot be ruled out, considering a possible stabilization by anchoring of the modified peptide to the membrane through its "lipidic foot." For hypothesis (2), it has been demonstrated that CTL *in vivo* priming requires access to the intracellular pathway (36), it can be assumed that the lipopeptides enter the cytosol by passive diffusion across the cell membrane: after delivery to the cytosol, they may be passively partitioned into all the cellular lipophilic compartments or be exported to the endoplasmic reticulum through a peptide transporter (37). If affinity of lipopeptides for cell membranes is involved in T cell priming, we think that it may be due to the hydrophobic properties of lipidic chains rather than to their lipophilicity, because Hart et al. (10) have shown that CTL priming with a short peptide requires hybridization to a hydrophobic amino acid sequence. In addition, preliminary results indicate that the acetylated V3S peptide, although less efficient than lipopeptide, is also able to prime CTL *in vivo* (not shown). Inasmuch as it has been demonstrated that addition of residues having hydrophobic side chains actually enhances the ability of antigenic peptide to stimulate Th clones (38), one would assume that the immunogenicity of lipopeptides is due to an increase in peptide antigenicity. Nevertheless, preliminary results are not consistent with this hypothesis, because lipopeptides are usually less antigenic *in vitro* than peptides, in terms of both the Th cell response (Fig. 4) and the CTL response (not shown).

Another possible explanation for the efficiency of lipopeptides in priming CTL *in vivo* is that lipopeptides target the Ag toward the appropriate APC, such as macrophages, because it has been suggested that a cognate interaction between macrophages and CTL precursors initiates class I MHC-restricted responses (39). This immunogenicity of lipopeptides vs peptides might be due to stimulation of Th cells that help in CTL induction. There-

fore, hypotheses concerning processing of lipopeptides must be extrapolated to their presentation to Th cells by MHC class II molecules.

REFERENCES

- Morrison, L. A., A. E. Lukacher, V. L. Braclale, D. P. Fan, and T. J. Braciale. 1986. Differences in antigen presentation to MHC class I and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 163:903.
- Takahashi, H., T. Takeshita, B. Morein, S. Putney, R. N. Germain, and J. A. Berzofsky. 1990. Induction of CD8⁺ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 344:873.
- Heeg, K., W. Kuon, and H. Wagner. 1991. Vaccination of class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes towards soluble antigens: immunostimulating-ovalbumin complexes enter the class I MHC-restricted antigen pathway and allow sensitization against the immunodominant peptide. *Eur. J. Immunol.* 21:1523.
- Noguchi, Y., T. Noguchi, T. Sato, Y. Yokoo, S. Itoh, M. Yoshida, T. Yoshiki, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, E. Nakayama, and H. Shiku. 1991. Priming for *in vitro* and *in vivo* anti-human lymphotropic virus type I cellular immunity by virus-related protein reconstituted into liposome. *J. Immunol.* 146:3599.
- Carbone, F. R., and M. J. Bevan. 1989. Induction of ovalbumin-specific cytotoxic T cells by *in vivo* peptide immunization. *J. Exp. Med.* 169:603.
- Ishioaka, G. Y., S. Colon, C. Miles, H. M. Grey, and R. W. Chesnut. 1989. Induction of class I MHC-restricted, peptide-specific cytolytic T lymphocytes by peptide priming *in vivo*. *J. Immunol.* 143:1094.
- Alchele, P., H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, and M. Schulz. 1990. Antiviral cytotoxic T cell response induced by *in vivo* priming with a free synthetic peptide. *J. Exp. Med.* 171:1815.
- Schulz, M., R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1991. Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:991.
- Kast, W. M., L. Roux, J. Curren, H. J. J. Blom, A. C. Voordouw, R. H. Melen, D. Kolakofsky, and C. Melief. 1991. Protection against lethal Sendai virus infection by *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with free synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2283.
- Hart, M. K., K. J. Weinhold, R. M. Scarsee, E. M. Washburn, C. A. Clark, T. J. Palker, and B. F. Haynes. 1991. Priming of anti-human immunodeficiency virus (HIV) CD8⁺ cytotoxic T cells *in vivo* by carrier-free HIV synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9448.
- Gao, X. M., B. Zheng, F. Y. Liew, S. Brett, and J. Tite. 1991. Priming of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by short synthetic peptides. *J. Immunol.* 147:3268.
- Deres, K., H. Schild, K. H. Wiesmüller, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1989. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 342:561.
- Schild, H., K. Deres, K. H. Wiesmüller, G. Jung, and H. J. Rammensee. 1991. Efficiency of peptides and lipopeptides for *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* 21:2649.
- Schild, H., M. Norda, K. Deres, K. Falk, O. Röttschke, K. H. Wiesmüller, G. Jung, and H. J. Rammensee. 1991. Fine specificity of cytotoxic T lymphocytes primed *in vivo* either with virus or synthetic lipopeptide vaccine or primed *in vitro* with peptide. *J. Exp. Med.* 174:1665.
- Takahashi, H., J. Cohen, A. Hosmalin, K. B. Cease, R. Houghten, J. L. Cornette, C. DeLisi, B. Moss, R. N. Germain, and J. A. Berzofsky. 1988. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3105.
- Takahashi, H., R. N. Germain, B. Moss, and J. A. Berzofsky. 1990. An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restricted help for itself. *J. Exp. Med.* 171:571.
- Rusche, J. R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D. L. Lynn, R. Grimalia, A. Langlois, R. C. Gallo, L. O. Arthur, P. J. Fischinger, D. P. Bolognesi, S. D. Putney, and T. J. Matthews. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino-acid sequence of the viral envelope. gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3198.
- Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2219.
- Mitchell, A. R., B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, and R. B. Merrifield. 1976. Tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 98:7358.
- Kiény, M. P., R. Lathe, Y. Rivière, K. Dott, D. Schmitt, M. Girard, L. Montagnier, and J. P. Lecocq. 1988. Improved antigenicity of the HIV Env protein by cleavage site removal. *Protein Eng.* 2:219.
- Rautmann, G., M. P. Kiény, R. Brandely, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier, and J. P. Lecocq. 1989. HIV-1 core protein expressed

- from recombinant vaccinia viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5:147.
22. Healy, F., J. Sire, E. Gomard, H. Yssel, B. R. Jordan, and J. P. Lévy. 1988. A study of functionally active amino acids involved in the interaction of HLA-A2 or HLA-A3 molecules with cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 141:2487.
 23. Martinon, F., E. Gomard, C. Hannoun, and J.-P. Lévy. 1990. In vitro human cytotoxic T cell responses against influenza A virus can be induced and selected by synthetic peptides. *Eur. J. Immunol.* 20:2171.
 24. Carbone, F. R., M. W. Moore, J. M. Sheil, and M. J. Bevan. 1988. Induction of cytotoxic T lymphocytes by primary in vitro stimulation with peptides. *J. Exp. Med.* 167:1767.
 25. Macatonia, S. E., P. M. Taylor, S. C. Knight, and B. A. Askonas. 1989. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J. Exp. Med.* 169:1255.
 26. Staerz, U. D., F. Zepp, R. Schmid, M. Hill, and J. Rothbard. 1989. Recruitment of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by an antigenic peptide. *Eur. J. Immunol.* 19:2191.
 27. Mizuochi, T., H. Golding, A. S. Rosenberg, L. H. Glimcher, T. R. Malek, and A. Singer. 1985. Both L3T4⁺ and Lyt-2⁺ helper T cells initiate cytotoxic T lymphocyte responses against allogeneic major histocompatibility antigens but not against trinitrophenyl-modified self. *J. Exp. Med.* 162:427.
 28. Christodoulou, M., I. Toth, R. A. Huges, W. Gibbons, E. Moczar, W. Hornebeck, and L. Robert. 1991. Lipidic peptide elastase inhibitors with improved membrane association and high activity. In *Peptide 1990*. E. Girald and D. Andreu, eds. ESOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands, p. 759.
 29. Hussain, R., I. Toth, R. A. Huges, N. G. Bowery, and W. Gibbons. 1991. Lipidic peptide conjugates of GABA with improved bioavailability. In *Peptide 1990*. E. Girald and D. Andreu, eds. ESOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands, p. 434.
 30. Hopp, T. P. 1984. Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Mol. Immunol.* 31:13.
 31. Lowell, G. H., W. Ripley Ballou, L. Smith, R. A. Wirtz, W. D. Zollinger, and W. T. Hockmeyer. 1988. Proteosome-lipopeptide vaccines: enhancement of immunogenicity for malaria CS peptides. *Science* 240:800.
 32. Neurath, A. R., N. Strick, and M. Girard. 1989. Hepatitis B virus surface antigen as carrier for synthetic peptides having an attached hydrophobic tail. *Mol. Immunol.* 26:53.
 33. Dal Monte, P. R., and F. C. Szoka. 1989. Antigen presentation by B cells and macrophages of cytochrome c and its antigenic fragment when conjugated to surface of liposomes. *Vaccine* 7:401.
 34. Frisch, B., S. Muller, J. P. Briand, M. H. V. Van Regenmortel, and F. Schuber. 1991. Parameters affecting the immunogenicity of a liposome-associated synthetic hexapeptide antigen. *Eur. J. Immunol.* 21:185.
 35. Culmann, B., E. Gomard, M. P. Kiény, B. Guy, F. Dreyfus, A. G. Saimot, D. Sereni, D. Sicard, and J. P. Lévy. 1991. Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8⁺ cells in the central region of the HIV-1 NEF protein. *J. Immunol.* 146:1560.
 36. Hosaka, Y. F., K. Sasoa, K. Yamanaka, J. R. Benninck, and J. W. Yewdell. 1988. Recognition of non-infectious influenza virus by class I-restricted murine cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol.* 140:606.
 37. Monaco, J., S. Cho, and M. Attaya. 1990. Transport protein genes in the murin MHC possible implications for antigen processing. *Science* 250:1723.
 38. Brown, L. E., D. C. Jackson, G. Tribbick, D. O. White, and H. M. Geysen. 1991. Extension of a minimal T cell determinant allows relaxation of the requirement for particular residues within the determinant. *Int. Immunol.* 3:1307.
 39. Debrick, J. E., P. A. Campbell, and U. D. Staerz. 1991. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses. *J. Immunol.* 147:2846.

Pimelautide or Trimexautide as Built-in Adjuvants Associated with an HIV-1-Derived Peptide: Synthesis and *in Vivo* Induction of Antibody and Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Response

Benoît Déprez, Hélène Gras-Masse,* Frédéric Martinon,[†] Elisabeth Gomard,[†] Jean-Paul Lévy,[†] and André Tartar

Faculté de Pharmacie, URA CNRS 1309, Chimie des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France, and Immunologie et Oncologie des maladies rétrovirales, INSERM U152, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 75014 Paris, France

Received August 2, 1994[⊗]

Covalent association of lipopeptidic immunostimulants is known to improve the immunogenicity of short peptides. In this paper, we describe the synthesis of four analytically pure immunogens, prepared by two different strategies, in which a hexadecameric peptide (V3) derived from the principal neutralizing domain of HIV-1 envelope glycoprotein was associated with two different murein-derived lauroyl-peptides, Pimelautide (RP 44102), or Trimexautide (RP 56142). The *in vivo* immunogenicity of these compounds was evaluated according to two different criteria: the ability to elicit a cellular-T cytotoxic (CTL) response) and the ability to stimulate antibody response. Our studies show that one of our compounds (TrxSucV3) was able to efficiently induce a relevant virus-specific CTL response, while another one (PimSucV3) was able to stimulate a strong antibody response to the linked peptide, or to a co-injected protein. These results suggest that both activities rely on different structure-activity relationships and that such a chemically defined model of peptide vaccines may be used to selectively stimulate subpopulations of immunocompetent cells.

Introduction

Vaccination against infectious diseases is an attractive alternative to chemotherapy, especially in the field of viral infections. In this context, there have been recently renewed attempts to develop a new generation of recombinant subunit or synthetic peptide vaccines: these vaccines can elicit specific, humoral, and cellular immune responses, and, being defined at the molecular level, are characterizable and potentially safe. Unfortunately, subunit or peptide antigens are usually not, or only weakly, immunogenic in the absence of immunological adjuvants.

Chemical modification of peptide antigens by built-in adjuvants¹ appears as a promising way of generating, with a relatively good accessibility, totally characterized vaccines, which might generate antibody and cellular responses: a fully characterized synthetic vaccine, associating the luteinizing hormone-release hormone to the murein-derived adjuvant *N*-acetylmuramyl-*L*-alanine-*D*-isoglutamine (MDP) was shown to promote an immunological castration in mice;² a low molecular mass synthetic vaccine against foot-and-mouth disease was described, which contained tripalmitoyl-*S*-glyceryl-cysteine serylserin (P3CSS) lipopeptide immunoadjuvant linked to peptide antigen derived from the virus protein VP1.³ Covalent association of the same lipopeptide immunoadjuvant to a glycopeptide was proposed as a model synthetic vaccine, eliciting immune response to tumor-associated carbohydrates antigens.⁴ However, real promise for peptides in terms of vaccines lies in their recently described ability to circumvent the need for active infection to stimulate virus-specific cytotoxic T-cell (CTL) response: modification by P3CSS⁵ or by a

simple α -aminohexadecanoic acid⁶ appears to be an effective method of diverting peptides into the endogenous processing pathway, allowing association with the class I MHC molecules and presentation at the surface of the cell.

Concerted efforts are now in progress to develop new immunoadjuvants containing a lipid moiety together with a stable peptidic part, which could be introduced on peptide antigens, in order to induce *in vivo* antigen-specific antibodies and cellular responses.⁷ In this context, the "desmuramyl peptidolipid" adjuvants, the lauroyl-*L*-alanine-*D*-glutamyl-*L*,*L*-2,6-diaminopimeloylglycine (pimelautide, RP 40639), and the lauroyl-*L*-alanine-*D*-glutamyl-*L*,*L*-2,6-diaminopimelic acid (trimexautide, RP 56142) (see ref 8 for a review) might be good candidates for a similar approach, although to our knowledge their activity in the context of covalent association has not yet been evaluated.

Both lauroyl-peptides (Figure 1) exhibit immunopotentiating activities which have been thoroughly documented: they stimulate phagocytic cells and, directly or indirectly, T lymphocytes, while little if any direct stimulation of B-lymphocytes can be evidenced. *In vivo*, these compounds exert an adjuvant effect on antibody production against various antigens and on delayed-type hypersensitivity, which has been correlated to the activation of the cell-mediated immunity. Unlike the synthetic lipopeptides derived from the N-terminus of the lipoprotein from the outer cell membrane of *Escherichia coli*, these molecules are devoid of any mitogenic effect. The lauroyl-peptides are active at parenteral doses ranging between 0.1 and 3 mg/kg. The acute toxicity of pimelautide in the mouse is very low (LD50 = 410 mg/kg iv). Although the compound is pyrogenic in the rabbit, in a study in dogs, sc injections given three times weekly for 1 month were well-tolerated up to a dose of 1 mg/kg.⁸

* Author to whom correspondence should be addressed at URA CNRS 1309.

[†] INSERM U152.

[⊗] Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, December 15, 1994.

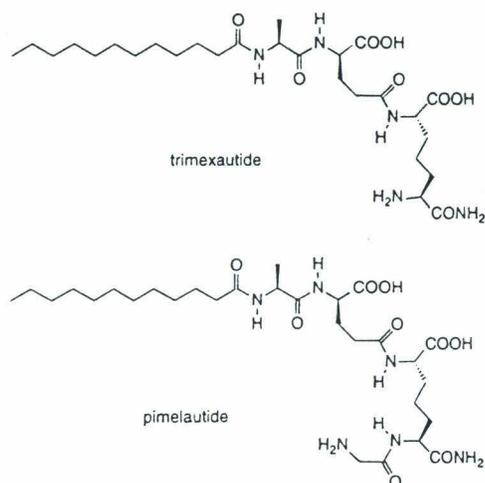


Figure 1. The lauroyl-peptide adjuvants, pimelautide and trimexautide.

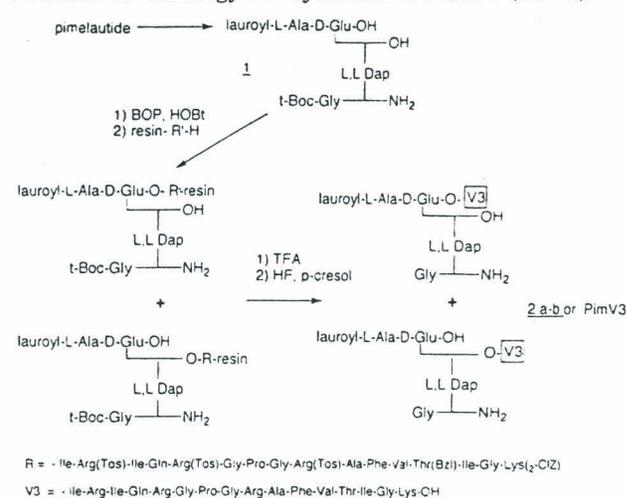
Here, we describe the synthesis and *in vivo* immunogenicity of three different constructs, associating a lauroylpeptide adjuvant and a peptide antigen; this peptide was selected from the third hypervariable domain of the HIV-1 envelope glycoprotein gp 120, the "V3 loop" (residues 303–335), which contains the principal binding site for neutralizing antibodies. We have selected as model antigen a 16-amino acids sequence (residues 312–327), herein referred as the V3 peptide, which, beside this crucially important B-cell epitope, contains at least one cytotoxic T-cell epitope, identified in the H-2^d restricted model within the sequence 319–327, and at least one T-helper epitope.⁹

Chemistry

Trimexautide and pimelautide are obtained by chemical coupling of lauric acid to a biologically inactive tetrapeptide:¹⁰ their chemical stability is compatible with all the solvents and reagents of conventional peptide chemistry. Once introduced as built-in adjuvant in a peptide antigen, the good stability in storage, pre-existing in both moieties of the construct, is likely to be preserved. Last but not least, the lipophilicity of their unique lauroyl chain is counterbalanced by the polarizable and ionizable groups of the peptide chain, conferring to this series of compounds an excellent water solubility, which facilitates their purification, characterization, sterilization by simple filtration of the solutions, and handling in biological tests.

Both lauroyl-peptides have three functional groups available for the formation of an amide bond with the peptide antigen: the α -carboxylic functions of the D-glutamic acid and of the diaminopimelamic acid and the α -amino function of the glycine residue (pimelautide), or of the diaminopimelamic acid residue (trimexautide). The lauroyl-peptide could theoretically be introduced in many functional groups on the hexadecapeptide antigen; however, as the side chains had to be preserved in order to retain the full antigenicity of the peptide, only the extremities were available for modification by the immunoadjuvant. As simplicity of manufacture is also an important practical criterion for vaccines, we decided to synthesize N-terminally modified peptides, which could be obtained by solid-phase synthesis using standard protocols and reagents.

Scheme 1. Strategy A: Synthesis of PimV3 (2a–b).

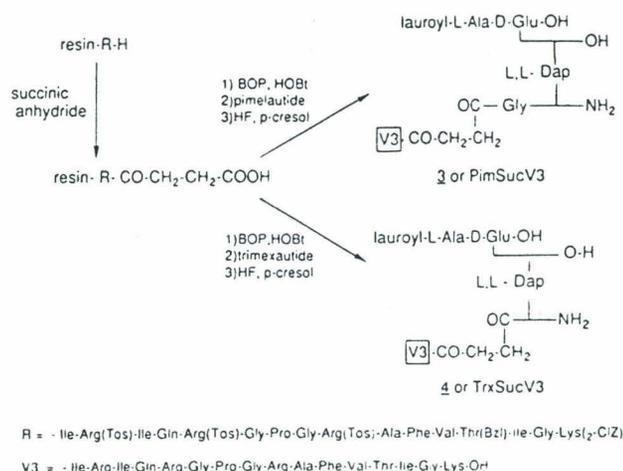


The resin-bound, protected hexadecapeptide antigen was built up by conventional stepwise solid-phase peptide method¹¹ by using *N*^α-*t*-Boc amino acids with benzyl-type side chain protections for trifunctional amino acids on a phenyl(acetamidomethyl)polystyrene resin. After deprotection by 50% TFA in dichloromethane of the N-terminal function of the hexadecapeptide and neutralization by diisopropylethylamine, the lauroyl-peptide adjuvants were introduced according to two possible strategies.

Strategy A. Activation and coupling of one of the two carboxylic functions of the lauroyl-peptide after protection of its amino function: The *N*^α-*t*-Boc-protected pimelautide was activated with the 1-(benzotriazolyl)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate in presence of 1-hydroxybenzotriazole and diisopropylethylamine (BOP/HOBt).² Using 1 equiv of activating reagents per lauroyl-peptide molecule, we formed the relatively stable hydroxybenzotriazole ester, compatible with long coupling times and a small excess of the electrophilic component. After final deprotection and cleavage, this strategy yielded a mixture of two regioisomers (compounds 2a–b or Pim-V3), which were not separated before immunization of the animals (Scheme 1). As expected, this compound was soluble in water. After dissolution in water at a concentration of 5 mg/mL, and sterilizing filtration on a cellulose acetate membrane, the concentration found in the soluble fraction was 84% of the initial peptide content.

Strategy B. Succinylation of the *N*^α-deprotected peptidyl-resin, activation of the newly introduced carboxylic function with the BOP/HOBt reagents, and coupling to the free amino group of the fully unprotected lauroyl-peptide (Scheme 2): After final deprotection and cleavage by hydrogen fluoride, this strategy yielded unambiguous compounds 3 (PimSucV3) or 4 (Trx-SucV3), depending on the introduced lauroyl-peptide (pimelautide or trimexautide, respectively).

Despite extensive washings of the activated peptidyl resin before introduction of the lauroyl-peptide, 8% of a compound containing two pimelautide molecules per molecule of peptide antigen was identified as a side product during the synthesis of 3, and 4% of a compound containing two trimexautide during the synthesis of 4, indicating either the persistence of adsorbed activating reagents on the peptidyl resin or a transfer of the activation to one of the carboxylic functions of the

Scheme 2. Strategy B: Synthesis of PimSucV3 (3) and TrxSucV3 (4)

lauroyl-peptide by transesterification, responsible for the coupling of a second lauroyl-peptide molecule (see Figure 2). Both side products were eliminated by purification using reversed-phase high-pressure liquid chromatography on a C4 support. Compounds 3 and 4 were also soluble in water; after dissolution in water at a concentration of 5 mg/mL and sterilizing filtration on a cellulose acetate membrane, the concentrations found in the soluble fraction were 98% and 88% of the initial peptide contents, respectively.

The different constructs were checked for homogeneity by HPLC on an ion-exchange support in the presence of an organic modifier or by RP-HPLC on a support with cyanopropyl modifying groups (Figure 3). Purified peptides had the expected amino acid composition, as determined by amino acid analysis after total acid hydrolysis. The expected molecular weight, determined by Plasma Desorption Mass Spectrometry, was observed.

Biological Tests

Antibody Response to the V3 Peptide. An evaluation of the antibody responses to the V3 peptide generated after immunization of BALB/c mice (five mice per condition) with compounds 2a–b, 3, 4, and the unmodified peptide V3, in water solution, was performed. As a reference, we also immunized mice with the peptide V3 emulsified in FCA or IFA for the boosts. Figure 4 represents the results of these experiments. Sera were collected on days 0, 31, 52, and 97 and pooled. After the third injection, the best results were obtained when PimSucV3 (3) was used as immunogen; the antibody response obtained was even stronger than when using CFA as adjuvant for the first immunization. The antibody response obtained after immunization with PimV3 or TrxSucV3 was comparable with the antibody response obtained using the V3 peptide in water solution, indicating a loss of the adjuvant properties leading to antibody production.

In Vivo Induction of a Virus-Specific Cytotoxic T-Cell Response.⁸ Early detectable, MHC class I-restricted CTL, capable of specifically lysing endogenously expressing antigen target cells (i.e. P815{H-2^d,DBA/2} cells, infected by a vaccinia virus recombinant for the *env* gene: *Vac-env*), could be generated in BALB/c (H-2^d) mice immunized with *Vac-env*. As

already described, the V3 peptide,⁶ although able to sensitive P815 cells for lysis by *Vac-env*-primed CTL, was unable to induce CTL *in vivo*.

In the following experiments, we evaluated the efficiency of *in vivo* priming according to two criteria: a short delay before detection of cytotoxic activity (before the 18th day of culture of the splenocytes, i.e., after only two *in vitro* stimulations) and the ability of the CTL to lyse specifically virus-infected target cells.

A representative experiment is shown in Figure 5. A strong priming of CTL able to lyse peptide-coated and *Vac-env*-infected target cells could be detected in Balb/c mice immunized sc with 50 nmol of TrxSucV3 (4) in PBS, followed by a boost injection 3 weeks later under the same conditions. After two *in vitro* stimulations of the splenocytes obtained from the immunized mice, a strong CTL response was observed that was able to lyse peptide-coated and (*Vac-env*) virus-infected target cells. No cytotoxic activity found when testing the same target cells infected with a control (*Vac-gag*) virus (Figure 5). The CTL lines were class I-restricted because they did not lyse allogeneic EL4{H-2^b,C57BL/6} target cells, in contrast to the histocompatible P815{H-2^d,DBA/2} (not shown). Neither of these target cell lines expressed class II MHC molecules. In addition, the CTL lines obtained in this experiment were sensitive to treatment with anti-CD8 plus complement, whereas treatment with anti-CD4 had no effect (not shown). Thus, effector cells induced by the compound 4 (TrxSucV3) were clearly class I-restricted CD8+ CTL.

In these conditions, we could detect CTL specific for virus-infected cells in 10 out of 12 mice immunized with TrxSucV3 (4). Under the same conditions, we could detect CTL in two out of four mice immunized with PimV3 2a–b and in two out of four mice immunized with PimSucV3 3.

In Vivo Adjuvanticity. The *in vivo* adjuvanticities of our compounds were tested with bovine serum albumin (BSA) as model protein antigen. Groups of mice were immunized twice with 100 μ g of bovine serum albumin alone or admixed with 100 μ g of the compounds 2a–b, 3, or 4 in water solution. The BSA-specific immune response, determined on day 28, could be markedly enhanced by addition of PimSucV3 (3) to the antigen (Figure 6). Although still able to enhance the response to BSA, both other compounds (PimV3 (2a–b) and TrxSucV3 (4)) were clearly less efficient in this test.

Conclusion

This work demonstrates the feasibility of synthesizing analytically pure compounds corresponding to covalent associations between the desmuremyl peptidolipid adjuvants pimelautide or trimexautide and a peptide antigen. We took advantage of the structural features of the pimelautide and trimexautide, a relatively low lipidic charge, the existence of ionized functions at physiological pH, and the absence of the acid-sensitive osidic moiety found in other murein-derived immunoadjuvants (such as MDP), which allowed us to synthesize at low cost readily soluble molecules that were easy to handle during chemical workup and biological trials.

The immunogenicity of these compounds was evaluated according to two different criteria: the ability to elicit *in vivo* a CTL response and the ability to stimulate

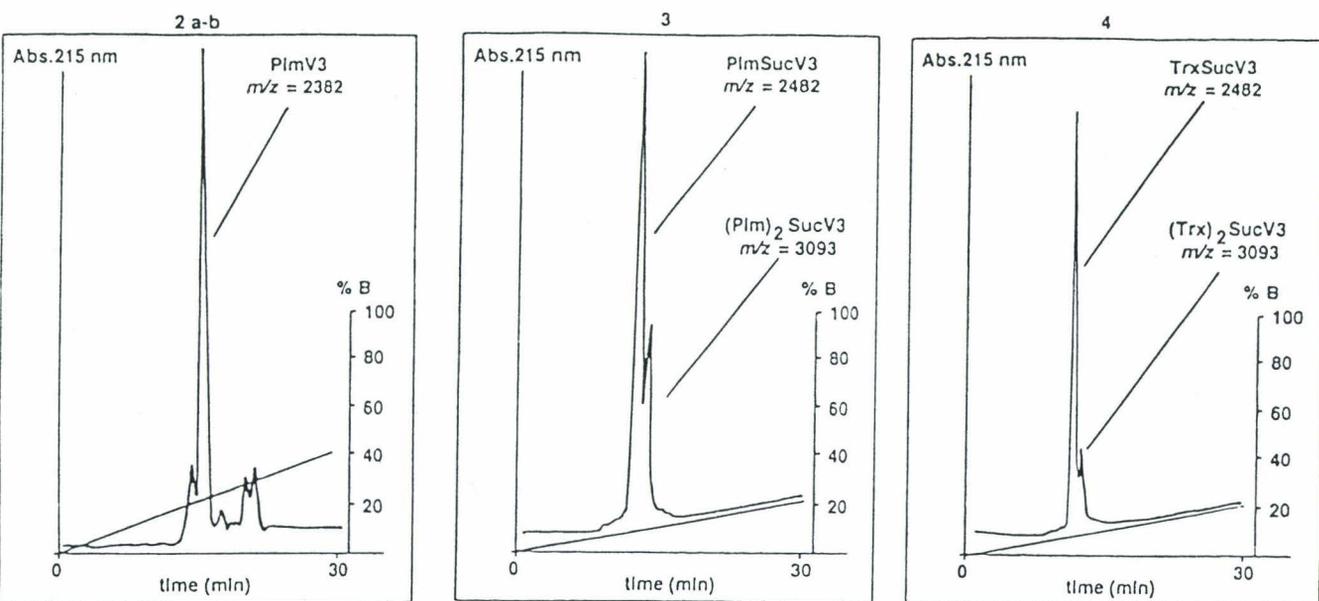


Figure 2. Ion-exchange HPLC of crude compounds **2a–b**, **3**, and **4** after HF cleavage. Solvent composition: (A) 5 mM phosphate buffer pH 3/acetonitrile, 50/50, v/v; (B) 400 mM NaCl, 5 mM phosphate buffer pH 3/acetonitrile, 50/50, v/v, on a Sulfoethyl Aspartimide (Nest-group) 250 × 4.6 mm column. The different peaks were collected and analyzed by plasma desorption mass spectrometry. Available molecular weight assignments (displayed on the chromatograms) show that introduction of lipopeptides containing unprotected carboxylic function on an activated peptidyl-resin leads to less than 10% of side products resulting of the incorporation of two lipopeptides (Pim)₂SucV3 and (Trx)₂SucV3, respectively.

antibody response. Our studies show that the compound TrxSucV3 (**4**) is able to efficiently induce a physiological, relevant, virus-specific CTL response, which does not correlate with a strong activity when evaluated in terms of antibody response, neither toward the linked peptide antigen nor toward a co-injected protein antigen (bovine serum albumine). Conversely, the compound PimSucV3 (**3**) was able to stimulate a strong antibody response to the linked peptide and to a co-injected protein, while this compound appeared less efficient in inducing a CTL response.

These results suggest that both activities rely on different structure–activity relationships and that such chemically defined models of peptide vaccines may be used to selectively stimulate subpopulations of immunocomponent cells. A detailed study of the T-helper cell response and of the cytokine production profile following immunization with these compounds is now in progress.

Experimental Section

Abbreviations: DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; DCM, dichloromethane; DIEA, diisopropylethylamine; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMF, *N,N*-dimethylformamide; EPES, *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; HOBT, 1-hydroxybenzotriazole; NMP, *N*-methylpyrrolidinone; TFA, trifluoroacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Dap, 2,6-diaminopimelic acid; BOP, (benzotriazolyl)oxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate; HF, hydrogen fluoride.

N^α-*tert*-butyloxycarbonyl (*N*-Boc) protected amino acids were purchased from Propeptide (Vert-Le-Petit, France); *N*-*t*-Boc-phenylacetamidomethyl resin (0.824 mmol/g) was from Applied Biosystems (Foster City, CA). DIEA, NMP, and DCC were from Aldrich (Beerse, Belgium); TFA, acetic anhydride, and HOBT were from Jansen (Geel, Belgium). BOP was from Michelieu Biotechnologies (S^{te}-Hyacinthe, Quebec, Canada), TFA was from Matheson (Secaucus, NJ), and acetonitrile (HPLC grade) was from Prolabo (Paris, France).

The lauroyl-peptide adjuvants pimelaute (RP 40 639) and imexaute (RP 56 142) were kindly provided by Dr. Pierre Aduron (Rhône-Poulenc, France). The V3 peptide was obtained as previously described.⁶

The vaccinia virus recombinant for the *env* gene of HIV-1-BRU (Vac-*env*) was kindly provided by Dr. M. P. Kiény (Transgene Strasbourg, France).

Amino Acid Analysis. The synthetic lipopeptides were characterized by amino acid analysis after acid hydrolysis (6 N HCl, 110 °C, 24 h in the presence of phenol under reduced pressure) on an amino acid analyzer Beckman model 7300. The standard 2,6-diaminopimelic acid used as a reference for amino acid quantification was kindly provided by Dr. D. Blanot (URA CNRS 1131, Orsay, France).

Solubility Determination. The lyophilized peptides were put in distilled water at a concentration of 5 mg/mL, sonicated during 30 s, and heated at 37 °C for 5 min. A titrated solution of norleucine was added as internal standard, and the solutions were filtered on Nalgène cellulose acetate membrane sterilizing units (porosity: 0.2 μm). Aliquots from both filtered and nonfiltered solutions were evaporated to dryness and hydrolyzed under acidic conditions, and the amino acids were quantified as above. The ratios [peptide]/[norleucine] were used to determine the peptide concentration changes after filtration.

Plasma Desorption Mass Spectrometry. Spectra were recorded on a BIO-ION 20, (Uppsala, Sweden). Approximately 10 μg of peptide were deposited onto a nitrocellulose-backed aluminumized foil. The spectra were accumulated during 10⁶ fission events (about 10 min).

After purification by reversed-phase HPLC on a Vydac C4 7μ 300 Å (9 × 250 mm) column, the peptides were checked for purity by analytical reversed-phase HPLC using a cyanopropyl-modified support Nucleosil 5CN 5μ (4.6 × 250 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany), using a H₂O/TFA 0.05%/acetonitrile gradient solvent system, and by ion exchange HPLC on a sulfoethyl aspartimide SCX column (4.6 × 100 mm) (Nest group - C.I.L., Ste-Foy-La-Grande, France), using an ionic strength gradient solvent composition from buffer A (acetonitrile 50% in 5 mM pH 3 phosphate buffer) to buffer B (NaCl 0.4 M in A).

Synthesis. 1. Synthesis of the Resine-Bound Hexadecapeptide H-Ile-Arg(Tos)-Ile-Gln-Arg(Tos)-Gly-Pro-Gly-Arg(Tos)-Ala-Phe-Val-Thr(Bzl)-Ile-Gly-Lys(2-ClZ)-resin. The protected peptidyl-resin was built up by using the conventional solid-phase "Boc-benzyl strategy" on a *N*-*t*-Boc-Gly-phenylacetamidomethyl alcohol resin (Applied Biosystems, Foster City, CA). The washings and coupling steps were performed with an automatic Applied Biosystem 430A peptide synthesizer. Side chain protections were as follows: arginine

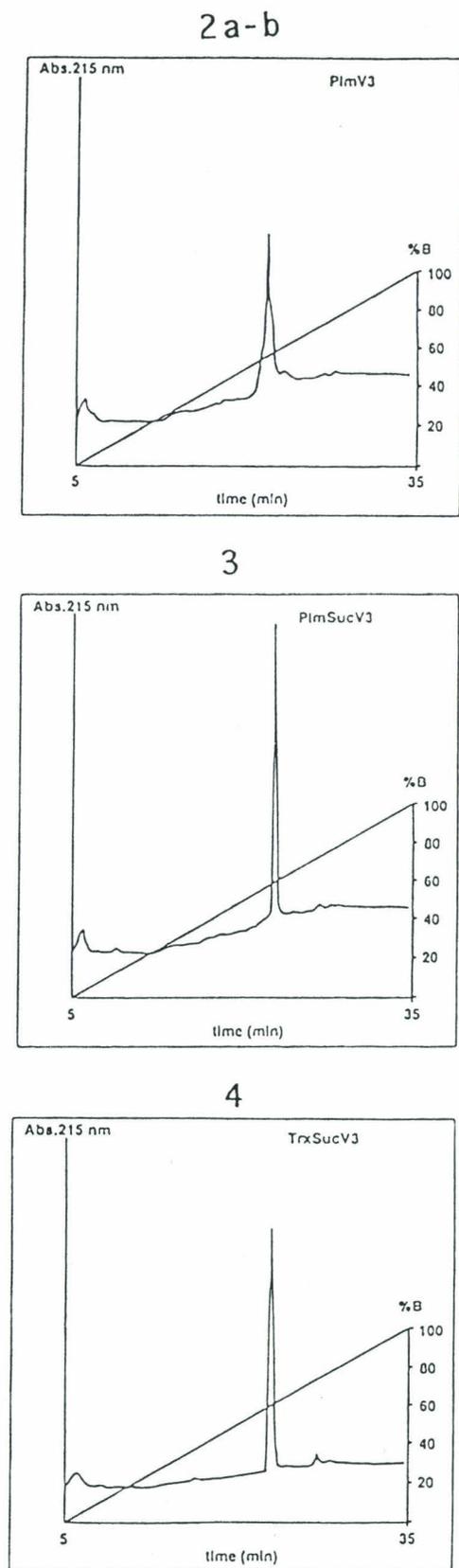


Figure 3. Analytical RP-HPLC of the purified compounds **2a-b**, **3**, and **4**. After purification on a Vydac C4 7 μ m 300 \AA column (9 \times 250 mm) column, the lipopeptides were analyzed on a Nucleosil CN 5 μ m, 300 \AA column (4.6 \times 250 mm). Solvent composition: (A) H₂O/TFA 0.05%; (B) acetonitrile/H₂O/TFA, 80/20/0.05%. Compound **2a-b** (PimV3) contains a mixture of two regioisomers (Scheme 1); as expected, analysis of this compound shows a broad shoulder.

(tosyl), lysine(*N*^ε-2-chlorobenzyloxycarbonyl), threonine (benzyl). A 4-fold excess of amino acid was used for couplings. *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole (1:1, 2 mmol each) in NMP was used for couplings.

2. *N*²-*N*-[*N*-Lauroyl-L-Ala]- γ -D-Glu-OH)-*N*⁶-{*N*-*t*-Boc-Gly)-L,L-Dap-OH (*N*-*t*-Boc Pimelautide, **1**). 230 mg (0.37 mmol) of pimelautide were dissolved in 1 M HNaCO₃ aqueous solution (10 mL) together with 10 mL of 0.1 M di-*tert*-butyldicarbonate in tertio-butanol. The pH was adjusted to 9 with 1 M Na₂CO₃ aqueous solution. After 2 h stirring, 230 mL of di-*tert*-butyl dicarbonate were added and the solution was stirred for 72 h. Then the solution was acidified to pH 3 with 1 M HCl and extracted with DCM (2 \times 25 mL). The organic layer was dried on Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure yielding a crystalline residue. Yield: 230 mg, 86% Ninhydrin test: negative. Amino acid analysis: Glu, 1.0 (1), Gly 0.99 (1), Ala 0.99 (1), Dap 1.02 (1).

3. *N*²-(*N*-{*N*-Lauroyl-L-Ala}- γ -D-Glu-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-OH)-*N*⁶-Gly)-L,L-Dap-OH + *N*²-(*N*-{*N*-Lauroyl-L-Ala}- γ -D-Glu-OH)-*N*⁶-Gly)-L,L-Dap-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-OH (PimV3, **2a-b**). *N*-*t*-Boc pimelautide **1** (145 mg, 0.2 mmol) was dissolved in NMP (6 mL) together with 88 mg of BOP, 27 mg of HOBT, and 100 mL of DIEA. The mixture was added to 350 mg (0.1 mmol) of the previously synthesized, *N*^α-deprotected resin-bound peptide. After 7 h of stirring, the resin was washed and dried. Hydrogen fluoride final deprotection and cleavage from the resin was performed in a Teflon-Kel F apparatus (Asti, Courbevoie, France), performing a 90 min treatment with HF/*p*-cresol/*p*-thiocresol 10:0.75:0.25, at 0 °C. The crude peptide was extracted with 5% acetic acid and purified by reversed-phase preparative HPLC, performed on Vydac C4 7 μ m 300 \AA column (9 \times 250 mm), with an acetonitrile-water-0.1% trifluoroacetic acid solvent system, using a 90 min gradient from 12% to 60% acetonitrile. Amino acid analysis: Thr 0.96 (1), Glu 1.97 (2), Pro 1.06 (1), Gly 3.54 (4), Ala 1.94 (2), Val 1.02 (1), Ile 2.88 (3), Phe 1.07 (1), Lys 0.96 (1), Arg 3.04 (3), Dap 0.99 (1). MS: *m/z* obs 2382 (expected 2380).

4. Succinylation of the Resin-Bound Hexadecapeptide. The *N*^α-succinyl-Ile-Arg(Tos)-Ile-Gln-Arg(Tos)-Gly-Pro-Gly-Arg(Tos)-Ala-Phe-Val-Thr(Bzl)-Ile-Gly-Lys(2-ClZ)-resin was obtained as follows: 600 mg (0.167 mmol) of the *N*^α-*t*-Boc peptidyl-resin obtained as described above was deprotected using a 50% TFA solution in DCM, washed with DCM, and then reacted with 6 mL of a 0.14 M solution of succinic anhydride in NMP. After double coupling (2 \times 20 min), the succinylation was complete and the resin was washed twice with NMP (2 \times 20 mL) and twice with DCM (2 \times 20 mL). The Ninhydrin test was negative.

5. *N*²-(*N*-{*N*-Lauroyl-L-Ala}- γ -D-Glu-OH)-*N*⁶-(*N*-{succinyl-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-OH}Gly)-L,L-Dap-OH (PimSucV3, **3**). BOP (221 mg, 0.5 mmol) was dissolved in NMP (5 mL) together with 71 mg (0.5 mmol) of HOBT and 200 mL (1.25 mmol) of DIEA. The mixture was added to the washed succinyl-resin-bound hexadecapeptide, stirred for 10 min, and then washed twice with DMF (2 \times 20 mL) and twice with DCM (2 \times 20 mL). A solution of 285 mg (0.5 mmol) of pimelautide in NMP (10 mL) was added to the previously activated resin. After overnight stirring, the resin was washed twice with NMP (20 mL), twice with DMF (20 mL), and twice with DCM (20 mL). A deactivation of any remaining activated ester was achieved using 10 mL of H₂O/DMF/DIEA, 4/5/1, v/v. HF deprotection, cleavage, and RP-HPLC purification were performed as described above. Amino acid analysis: Thr 0.95 (1), Glu 1.83 (2), Pro 1.17 (1), Gly 3.99 (4), Ala 1.88 (2), Val 1.09 (1), Ile 2.90 (3), Phe 1.08 (1), Lys 0.93 (1), Arg 3.12 (3), Dap 0.93 (1). MS: *m/z* obs 2482 (expected 2480).

6. *N*²-(*N*-{*N*-Lauroyl-L-Ala}- γ -D-Glu-OH)-*N*⁶-(succinyl-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-OH)-L,L-Dap-OH (TrxSucV3, **4**). Trimexautide (315 mg) in NMP (10 mL) was added to the succinyl-resin-bound hexadecapeptide activated as above. HF deprotection, cleavage, and RP-HPLC purification were performed as described above. Amino acid analysis: Thr 0.97 (1), Glu 2.11

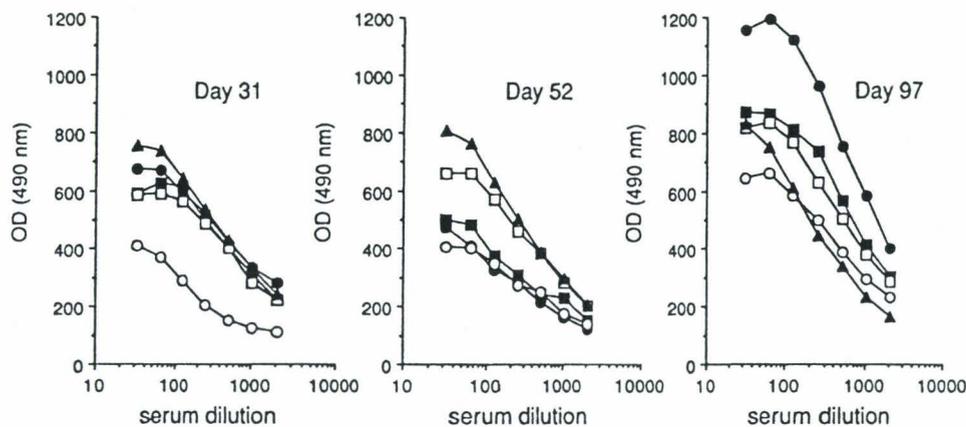


Figure 4. IgG antibody production to the V3 peptide. Groups of five Balb/c mice (age 6–8 weeks) were immunized sc on days 0, 17, 40, and 90 with 50 nmol of PimSucV3 (3) (closed circles), TrxSucV3 (4) (closed squares), PimV3 (2a–b) (open squares), V3 peptide alone (open circles), or in presence of complete Freund adjuvant (closed triangles). Sera were collected on days 0, 31, 52, and 97 and pooled. Specific anti-peptide V3 Ig-G contents were measured by ELISA.

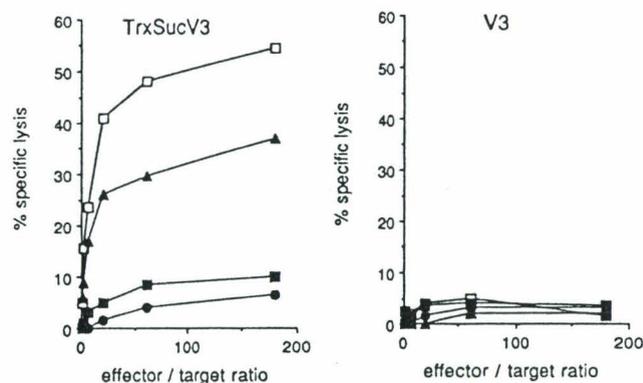


Figure 5. Cytolytic activity of cell lines derived from BALB/c (H-2^d) mice: animals were primed sc with 50 nmol of TrxSucV3 (4) (left panel) in saline, or 50 nmol of V3 peptide alone (right panel). Three weeks later, they were boosted in identical conditions. Fifteen days after the last injection, spleens were removed for *in vitro* lymphocyte stimulation. Cell lines were tested for their capacity to lyse P815 target cells pretreated with the V3 peptide (open squares), P815 target cells infected with Vac-env (closed triangles) or with a virus expressing an irrelevant protein (Vac-gag, closed squares), or in culture medium alone (closed circles).

(2), Pro 0.95 (1), Gly 3.08 (3), Ala 1.99 (2), Val 0.95 (1), Ile 2.85 (3), Phe 1.05 (1), Lys 0.98 (1), Arg 2.95 (3), Dap 1.05 (1). Plasma desorption mass spectrum: *m/z* obs 2423 (expected 2425).

Biological Tests. ELISA. 96-well plates (Nunc) were incubated overnight at room temperature with 200 μ L of a 10 μ g/mL solution of the V3 peptide in a 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 and blocked afterward with 300 μ L of a 2% ULTROSER HY solution (for cell culture, IBF, LKB, Villeneuve-la-Garenne) in 1.8% NaCl/0.01 M PBS, pH 7.2, during 1 h at room temperature. After washing (1.8% NaCl/0.01 M PBS pH 7.2/0.1% Tween-20), dilutions of sera in 2% ULTROSER HY/1.8% NaCl/0.01 M PBS, pH 7.2, were put in duplicate wells and incubated for 2 h at 37 $^{\circ}$ C; the presence of antibodies was revealed after multiple washings by adding 200 μ L of 1/10 000 goat-anti mice IgG g-chain specific or anti IgM μ -chain specific (Sigma, St. Louis, MO). After incubation (2 h at 37 $^{\circ}$ C) and washings, a substrate solution (citrate buffer/H₂O₂/o-phenylenediamine dihydrochloride) was added. After a 30 min incubation protected from light at room temperature, the reaction was stopped using 100 μ L of H₂SO₄ (4 N). Absorbance was recorded at 492 nm using a microplate reader (Dynatech). Titers were determined as the inverse of the maximal dilution giving a 1 absorbance unit signal.

Generation of Cytolytic T-Lymphocytes. Splenocytes were cultured in 24-well plates at 5 \times 10⁶ cells per well in 2 mL of DMEM supplemented with 100 units/mL penicillin, 100

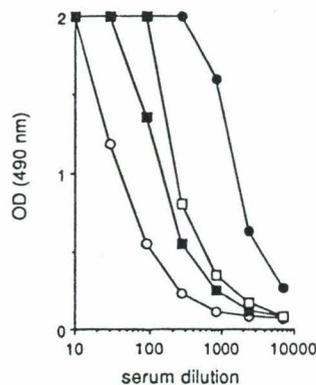


Figure 6. Adjuvant activity of the lipopeptides. Groups of five Balb/c mice (age 6–8 weeks) were immunized sc on days 1 and 14 with 100 μ g of bovine serum albumine alone (open circles) or in combination with 100 μ g of PimSucV3 (compound 3, closed circles), TrxSucV3 (compound 4, closed squares), or PimV3 (compound 2a–b, open squares). Animals were bled on day 28, on which the sera of each group were pooled. Sera were tested for their BSA specific Ig content by ELISA. The data represents mean values obtained from triplicate experiments.

μ g/mL, streptomycin, 2 mM L-glutamin, nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2.5 mg/mL amphotericin B, 50 μ M 2-mercaptoethanol, and 10% heat-inactivated FCS (Flow Laboratories, Irvine, Scotland) (culture medium) containing 3–5 μ M V3 peptide. Additional *in vitro* restimulations were performed weekly by mixing 5 \times 10⁵ effector cells with 5 \times 10⁶ irradiated (4000 rads) syngeneic spleen cells in 2 mL per well of culture medium containing synthetic peptide and supplemented with 5% of IL-2 containing supernatant prepared as described.¹³ The Mab RL172.4 (anti-CD4)¹⁴ and AD4 (anti-CD8)¹⁵ and guinea pig serum as source of complement were used to deplete lymphocyte subpopulations *in vitro*.

Cytotoxicity Assays. P815 (H-2^d, DBA/2) or EL4 (H-2^b, C57BL/6) cells [(1–2) \times 10⁶] in 200 μ L of culture medium were labeled with 100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ (CEA, Gif sur Yvette, France) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. After two washings, 3000 labeled targets and serial dilutions of effector cells were incubated in 200 μ L of culture medium in round-bottomed microtiter plates. The V3 peptides were included in the appropriate assays at 3 μ M. In the case of virus-infected targets, cells were incubated for 90 min at 37 $^{\circ}$ C with 10 PFU per cell of recombinant vaccinia virus as described.¹⁶ The cytotoxicity assay was terminated after a 4 h incubation at 37 $^{\circ}$ C, and 100 μ L of supernatant were harvested and specific lysis was determined as % specific lysis = 100 \times (experimental – spontaneous release)/(half total ⁵¹Cr incorporated – spontaneous release). In all experiments,

spontaneous release in the absence of effector cells was <20% of maximum release.

Acknowledgment. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA. We gratefully acknowledge Dr. Pierre Laduron (Rhône-Poulenc, France) for a generous gift of pimelautide and trimexautide, Dr. D. Blanot (URA CNRS 1131, Orsay, France) for the Dap standard, and Dr. M. P. Kiény (Transgene, Strasbourg, France) for providing us the vaccinia viruses recombinant for the *env* and *gag* genes of HIV-1-BRU (Vac-*env* and Vac-*gag*).

References

- Jung, G.; Wiesmüller, K. H.; Becker, G.; Bühring, H. J.; Bessler, W. G. Increased production of specific antibodies by presentation of the antigen determinants with covalently coupled lipopeptide mitogens. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *10*, 872-873.
- Bernard, J. M.; Gras-Masse, H.; Drobecq, H.; Tartar, A.; Le-francier, P.; Hosmalin, A.; Carelli, C.; Chedid, L. Synthesis of conjugates between luteinizing releasing hormone (LH-RH) and N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) models of totally synthetic vaccines. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *29*, 455-463.
- Wiesmüller, K. H.; Jung, G.; Hess, G. Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* **1989**, *7*, 29-33.
- Toyokuni, T.; Dean, B.; Cai, S.; Boivin, D.; Hakomori, S.; Singhal, A. Synthetic vaccines synthesis of a dimeric Tn antigen-lipopeptide conjugate that elicits immune response against Tn-expressing glycoproteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 395-396.
- Deres, K.; Schild, H.; Wiesmüller, K. H.; Jung, G.; Rammensee, H. G. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* **1989**, *342*, 561.
- Martinon, F.; Gras-Masse, H.; Boutillon, C.; Chirat, F.; Deprez, B.; Guillet, J. G.; Gomard, E.; Tartar, A.; Levy, J. P. Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. *J. Immunol.* **1992**, *149*, 3416-3422.
- Metzger, J.; Jung, G.; Bessler, W. G.; Hoffmann, P.; Strecker, M.; Lieberknecht, A.; Schmidt, U. Lipopeptides containing 2-(palmitoylamino)-6,7-bis(palmitoyloxy)heptanoic acid: synthesis, stereospecific stimulation of B-lymphocytes and macrophages, and adjuvanticity *in vivo* and *in vitro*. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1969-1974.
- Baschang, G. Muramylpeptides and lipopeptides: studies towards immunostimulants. Tetrahedron report number 262. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 6331-6360.
- Takahashi, H.; Cohen, J.; Hosmalin, A.; Cease, K. B.; Houghten, R.; Cornette, J. L.; DeLisi, C.; Moss, B.; Germain, R. N.; Berzofsky, J. A. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 3105-3109.
- Werner, G. H.; Floch, F.; Migliore-Samour, D.; Jollès, P. Immunomodulating peptides. *Experientia* **1986**, *42*, 521-531.
- Merrifield, R. B. Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154. Merrifield, R. B. Solid phase synthesis. *Science* **1986**, *232*, 341-347.
- Hudson, D. Methodological implication of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 617-624. Le-Nguyen, D.; Heitz, A.; Castro, B. Renin substrate. Part 2. Rapid solid phase peptide synthesis of ratine sequence tetradecapeptide using BOP reagent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 1915-1916.
- Healy, F.; Sire, J.; Gomard, E.; Yssel, H.; Jordan, B. R.; Lévy, J.-P. A study of functionally active amino acids involved in the interaction of HLA-A2 or HLA-A3 molecules with cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 2487-2493.
- Ceredig, R.; Lowenthal, J. W.; Nabholz, M.; Macdonald, H. R. Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells. *Nature* **1985**, *314*, 98-102.
- Gottlieb, P. D.; Marshak-Rothstein, A.; Auditore-Hagreaves, K.; Berkoben, D. B.; August, D. A.; Rosche, R. M.; Benedetto, J. D. Construction and properties of new Lyt-congeneic strains and anti-Lyt-2,2 and anti-Lyt-3,1 monoclonal antibodies. *Immunogenetics* **1980**, *10*, 545-550.
- Martinon, F.; Gomard, E.; Hannoun, C.; Levy, J.-P. *In vitro* human cytotoxic T cell responses against influenza A virus can be induced and selected by synthetic peptides. *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 2171-2176.

JM940496T

Long-lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced *in vivo* with chimeric-multirestricted lipopeptides

Jean-Pierre Sauzet*†, Benoit Déprez†, Frédéric Martinon*, Jean-Gérard Guillet*, Hélène Gras-Masse† and Elisabeth Gomard*

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) play a major role in protective immunity against viral diseases. However, the antigenic formulations that can be used in vaccinations able to generate virus-specific CTL responses in vivo have yet to be defined. We have previously shown that HIV-1-specific CTL can be elicited in mice by injecting without adjuvant a synthetic peptide of the envelope glycoprotein that has been modified by the addition of a simple lipid tail to the end of the sequence (lipopeptide). The present study set out to address the question of whether such immunogens may be appropriate for preparing a human synthetic vaccine. We first showed that CTL were effectively induced by lipopeptides when given s.c. or i.p. We evidenced that the in vivo induction required stimulation of a concomitant specific T helper cell response, implying the presence of at least one CD4 epitope in the synthetic sequence used. Bearing in mind the particular properties that would be required in a prospective human peptide vaccine, we conceived a strategy in which a virus-specific CTL response could be generated in mice of different haplotypes using a single lipopeptide. We therefore tested a lipopeptide construct that integrated a synthetic sequence having three colinear epitopes of the influenza virus nucleoprotein, each restricted to a different H-2 haplotype. We found that a CTL response could be elicited to all three epitopes of this chimeric multirestricted lipopeptide construct. Finally, we have attempted to estimate the duration of the responses; strong CTL activities were still present up to six months after the last injection. These findings indicate that this approach may be suitable for developing a synthetic vaccine for human use.

Keywords: Cytotoxic T lymphocytes; lipopeptide; long-lasting responses

CD8+ CTLs that recognize specific MHC Class I/peptide complexes on antigenic cells play a crucial role in recovery from virus infection. Vaccination strategies designed to find an effective immunogen for generating such a virus-specific cytotoxic responses *in vivo* have been pursued for several years. Recombinant viruses¹⁻⁵ and bacteria^{6,7} have proved excellent inducers of CTL, but the use of either in human vaccination is not without risk, as it involves vaccination with live material. Antigenic subunits, such as purified viral proteins, are good inducers of antibody responses, but in MHC class I responses, due to inefficient processing, they are less immunogenic unless associated with lipids⁸, or incorpo-

rated into liposomes⁹. Ever since it was shown that the antigens recognized by CTL were peptides, there has been considerable interest in synthetic vaccines. Such peptides have been successfully used as immunogens (reviewed in Ref. 10), but they are in fact poorly immunogenic for CTL *in vivo* and always require adjuvants. The immunogenicity of peptides, however, is enhanced by the introduction of a complex lipid tail at one end of the sequence¹¹. We obtained similar results using much simpler lipopeptide constructs; these also render adjuvant unnecessary¹². However, further information is needed before the use of such lipopeptides could be considered in human vaccination. The present study addresses several questions raised by the use of such constructs in a hypothetical synthetic vaccine. We induced immunity against viruses such as the influenza virus by vaccination with lipopeptides, and examined the influence of the route of immunization on the effectiveness of CTL induction by these constructs using peptide sequences from the influenza virus nucleoprotein (NP). We also determined which features of lipopeptides enabled them to generate the CTL response, and

*Laboratoire d'Immunologie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, INSERM U152, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 27 Rue du Fbg. Saint-Jacques, 75014 Paris, France. †Université de Lille II, URA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cédex, France. ‡To whom correspondence should be addressed. (Received 17 August 1994; revised 26 October 1994; accepted 22 November 1994)

particularly the need to induce a concomitant CD4+ mediated T helper cell response. These data provided a clearer understanding of the mechanisms implicated *in vivo*.

A major problem encountered in the use of peptide vaccines for human vaccination is the need to overcome the restriction barrier. It is therefore important to determine whether lipopeptides can incorporate long synthetic sequences, and so include several different CD8 epitopes. The present report shows that an influenza virus-specific CTL response can be elicited by such lipopeptide preparations in mice of different haplotypes, each of which present a distinct NP peptide in a MHC-restricted fashion. Finally, since long-term immunity is critical for all effective vaccines, we sought to determine the extent and durability of the cellular responses induced by our constructs.

MATERIALS AND METHODS

Peptide and lipopeptide synthesis

All the peptides and lipopeptide equivalents used in this study contain CD8 epitopes (Table 1). Peptides NP50-63 (NP1), NP147-158 R₁₅₆-(NP2), NP147-155 (NP2S), NP365-379 (NP3) and (NP50-63)-(NP147-158)-(NP365-379) (NP123) are from the influenza A virus nucleoprotein.

The peptides were synthesized using the conventional solid-phase 'Boc-benzyl strategy'¹⁸ in an automated Applied Biosystem 470A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, USA), using double coupling and systematic capping with acetic anhydride. *Tert*-butyloxycarbonyl (*t*-Boc) Hda was synthesized and introduced as described in Martinon *et al.*¹²

The peptides were checked for homogeneity by analytical RP-HPLC, and their identity was checked by amino-acid analysis after acid hydrolysis. The incorporation of the exotic amino acid alpha-amino-hexadecanoic acid (Hda) was assessed by determining the molecular mass by plasma desorption mass spectrometry.

Viruses

A/Puerto Rico/8/34 (A/PR/8, H₁N₁) and A/New Texas (A/NT, H₃N₂) and B/Yamagata (B/Yam) influenza viruses were generously provided by C. Hannoun (Institut Pasteur, Paris, France). They were grown in embryonated chicken eggs and the filtered allantoic fluid was used for *in vivo* immunization of mice, and for *in vitro* infection of target cells in cytotoxicity assays.

Immunization of mice

BALB/c (H-2^d), C57BL/6 (B/6) (H-2^b), and B/6 × CBA F1 (H-2^{b×k}) mice were purchased from Iffa Credo (L'Arbresles, France). Mice were primed s.c. or i.p. with 50 nmol of free peptide or lipopeptide in normal saline. They were boosted three weeks later using identical conditions. Their spleen was removed for CTL generation 2 or 24 weeks after the last injection. To study the induction of a T helper cell response, mice

were immunized with lipopeptides in mild adjuvant (IFA). Their spleens were removed two weeks after the last injection.

IL-2 release assays

Single spleen suspensions were made and the cells washed twice in RPMI 1640 before resuspension in RPMI 1640 supplemented with 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine, non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 50 µM 2-ME and 1% Nutridoma SP (Boehringer-Mannheim) at a concentration of 5 × 10⁶ cells ml⁻¹. A total of 100 µl of cell suspension was placed into round-bottomed microtiter wells (Costar) and peptides added at the indicated concentrations. Cultures were set up in triplicate. After a 24 h incubation at 37°C and 5% CO₂, 100 µl well⁻¹ of supernatant were transferred and tested for the IL-2+IL-4 content using the CTL.L2 line (10⁴ cells well⁻¹). (³H)thymidine was added (1 µCi well⁻¹) during the last 6 h of a 24 h incubation. The cells were harvested on an automatic cell harvester (Skatron Inc., Sterling, VA, USA) and (³H)thymidine incorporation was quantified by scintillation counting.

Generation of CTL

In vitro stimulation was performed by mixing 3 × 10⁶ responding cells with 6 × 10⁶ irradiated (4000 rads) stimulating cells in 2 ml culture medium (RPMI 1640 supplemented with 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine, nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 50 µM 2-ME and 10% heat inactivated FCS). These stimulating cells were obtained by incubating 10 × 10⁶ syngeneic spleen cells from naive mice in 1 ml medium containing 30 µg synthetic peptide for 3 h at 37°C. These cells were washed before use. In most experiments, an additional *in vitro* stimulation was performed one week later using stimulating cells prepared as described before in culture medium supplemented with 5% human IL-2-containing supernatant¹⁹. The cytotoxicity was evaluated 5–6 days after each *in vitro* stimulation.

Cytotoxicity assays

The target cells used were P815 (H-2^d, DBA/2), RDM4 (H-2^k, CBA) and EL4 (H-2^b, B/6) tumor cell lines. Influenza virus-infected cells were obtained by incubating cells with 100 HAU influenza virus; they were used as targets 2–3 h later. Peptide pulsed-target cells were prepared by a similar incubation with peptide (final concentration 20 µg ml⁻¹) and used immediately.

Uninfected or infected target cells were labeled with 100 µCi Na₂⁵¹CrO₄ (CEA, Gif sur Yvette, France) for 90 min at 37°C and washed twice. Target cells (5000) and serial dilutions of effector cells were then incubated in 200 µl culture medium in round-bottomed microtiter plates for 4 h at 37°C, and the assay was terminated by gamma counting the supernatants. The % specific lysis was calculated as: 100 × (experimental - spontaneous release) / (total ⁵¹Cr incorporated) - spontaneous release. Spontaneous release in the absence of effector cells was less than 20% of total ⁵¹Cr incorporated in all experiments.

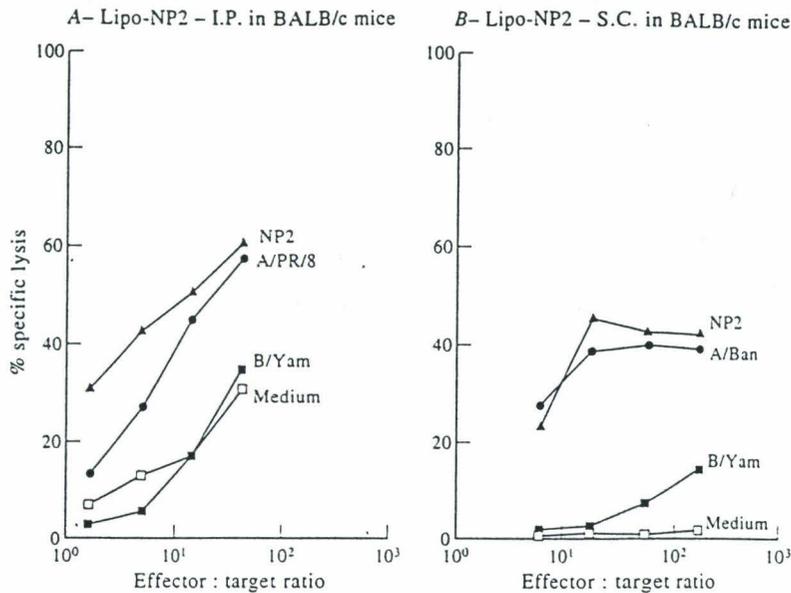


Figure 1 *In vivo* priming of influenza virus-specific CTL with NP lipopeptide constructs. Spleen cells from BALB/c mice immunized i.p. (A) or s.c. (B) with Lipo-NP2 were stimulated twice *in vitro* with NP2-pulsed BALB/c spleen cells. Cytotoxic activity was measured on P815 target cells pretreated as indicated in the figure

RESULTS

Generation of influenza nucleoprotein-specific CTL by lipopeptide constructs

ENV-specific CTL responses can be efficiently primed in BALB/c mice by injecting Lipo-V3L i.p., even without adjuvant¹². These results were extended by evaluating the immunogenic potency of the lipopeptide construct in the influenza virus nucleoprotein antigenic system. Deres *et al.*¹¹ showed that it is possible to prime influenza-specific CTL responses *in vivo* with a synthetic peptide (NP2) from this protein, covalently linked to a lipotriptide possessing immunoadjuvant properties. We synthesized a NP2 peptide (Lipo-NP2) modified as described in Ref. 12 in the V3 ENV model by adding a C-terminal amino acid possessing a 14-carbon aliphatic side chain without known adjuvant properties. We injected this into BALB/c mice, both i.p. and s.c. Lipo-NP2 induced H-2^d-restricted influenza virus-specific CTL responses, when given by either route (Figure 1). The free peptide was not immunogenic when injected under the same conditions (not shown). Thus lipopeptides containing a simple modifying lipid amino acid can induce comparable CTL responses in different viral systems.

Influence of T helper cells on *in vivo* priming with lipopeptides

The tests on the construct Lipo-NP3, which includes a known H-2^b-restricted CTL epitope of the influenza virus nucleoprotein (Table 1), revealed no CTL response in B/6 mice (Figure 2A), even when IFA was used for priming (not shown). One explanation for this could be a lack of T helper cell activation. The previously reported synthetic peptides V3L¹² and NP2 have been shown to induce specific CD4⁺ T helper responses in BALB/c mice, whereas NP3, although it includes a CTL epitope, contains no CD4 epitope in this H-2 haplotype (Table 1). The corresponding lipopeptide (Lipo-NP3) generated no T helper cell response as measured by

specific IL-2 secretion following *in vitro* stimulation assay in B/6 mice (Figure 2C). Since peptide NP3 is known to activate T helper cells in the H-2^k haplotype¹⁷, we checked that Lipo-NP3 was effective at inducing a T helper cell response in H-2^{b^xk} haplotype (Figure 2D). Due to subtype-specific mutations between the sequence of NP3 from A/PR/8 used in this study and the corresponding sequence from other A strains, the CTL response was studied on target cells infected with the A/PR/8 strain. In addition to a specific T helper cell induction, Figure 2B shows that F1 mice were also able to generate a virus-specific CTL response to Lipo-NP3. The free unmodified NP3 peptide was not immunogenic in these F1 mice (not shown).

Immunogenicity of lipopeptide constructs including long synthetic sequences

The capacity of long lipopeptide sequences that included several different CD8 and CD4 epitopes to induce CTL was tested. We have previously shown that a 34-mer sequence can generate Th and CTL responses in the ENV system¹², but this sequence only contains a single CD8 epitope. Several CD8 epitopes were incorporated into a construct that had a long synthetic sequence containing three colinear CTL epitopes of the influenza nucleoprotein, each with a different H-2 restriction. This NP123 lipopeptide (see Table 1) was first injected s.c. into BALB/c mice which should normally respond to the central epitope, NP2. The H-2^d-restricted virus-specific CTLs were primed with both Lipo-NP2 (Figure 1) and Lipo-NP123 (Figure 3A), suggesting that NP2 is still immunogenic even when it is in the center of a much longer sequence.

The immunogenicity of the N-terminal NP1 sequence was then evaluated in CBA mice. Figure 3B shows that strong H-2^k-restricted virus-specific CTL activities were also elicited in this H-2 haplotype with the LipoNP-123 construct.

We finally tested the same construct in F1 mice whose H-2^{b^xk} hybrid haplotype should allow induction of a

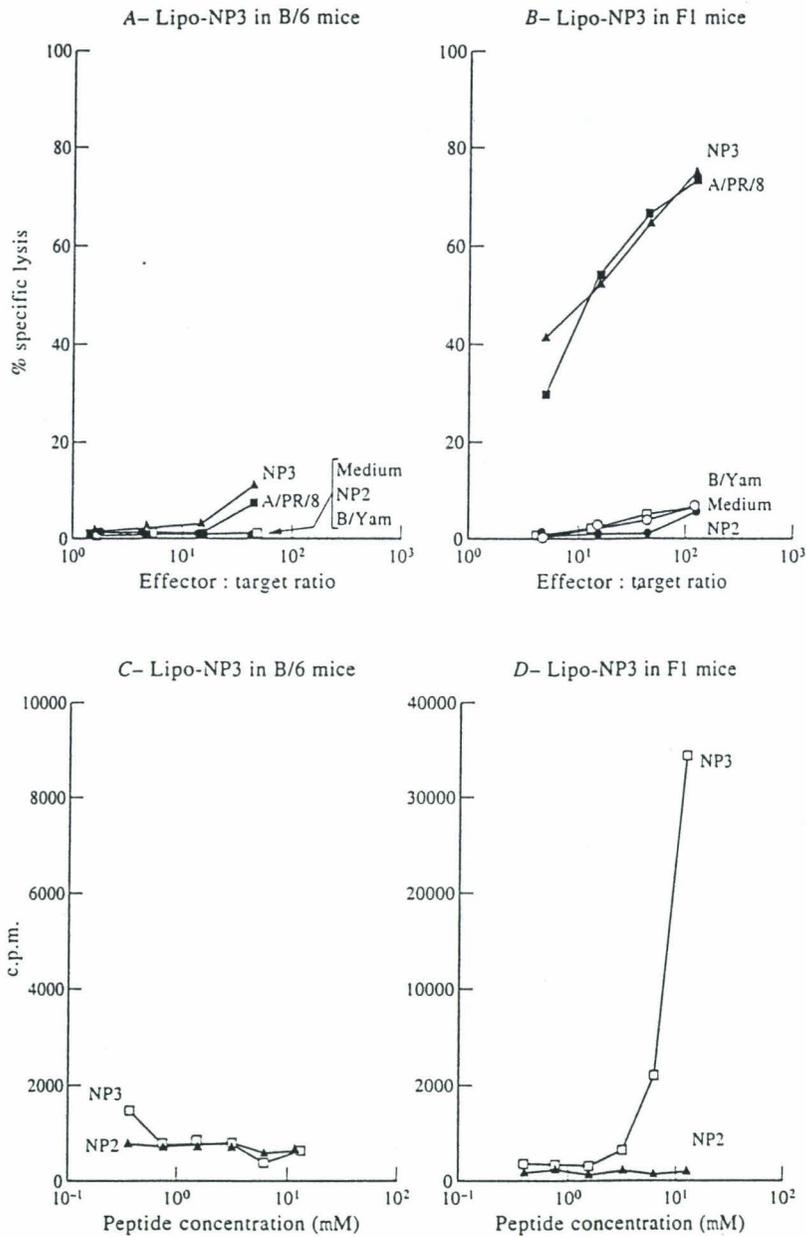


Figure 2 Test of Lipo-NP3 construct in B/6 and F1 mice. Spleen cells from B/6 (A, C) or B/6×CBA F1 (B, D) mice immunized with Lipo-NP3 were stimulated twice *in vitro* with NP3-pulsed B/6 spleen cells. Cytotoxic activity was measured on EL4 target cells pretreated as indicated (A and B). In another experiment, spleen cells were cultured in the presence of peptide NP3, or the irrelevant NP2 peptide. After a 24 h incubation, supernatants were collected and assayed for their content in IL-2, using (³H)TdR incorporation of the IL-2 dependent CTL.L line (B and D)

CTL response to the C-terminal (NP3) epitope. The Lipo-NP123 construct also effectively produced NP3-specific H-2^b-restricted CTL in F1 mice (Figure 3C). Lipo-NP123 did not induce NP1-specific H-2^k-restricted CTL in these F1 mice (not shown), suggesting that there is an immunodominantly regulated response to NP1 within Lipo-NP123 in this particular context.

Long-term CTL in mice primed with lipopeptides

Lastly, we evaluated the ability of lipopeptide constructs to induce long-term cytotoxic responses, as this is a major parameter in the design of any vaccine. The CTL responses to influenza virus NP were studied for up to six months after the last injection. The spleens of BALB/c and F1 mice immunized s.c. with Lipo-NP123 six months earlier were restimulated *in vitro* either with peptides NP2 or NP3. Strong specific CTL responses to

these peptides were still present in BALB/c and F1 mice, respectively (Figures 4A and 4B).

DISCUSSION

We have previously reported that it was possible to generate HIV-1 ENV-specific CTL responses in mice *in vivo* by injecting, under clinically acceptable conditions, a peptide derived from the HIV-1 ENV protein, provided it bore a simple lipid amino acid without known immunoadjuvant properties in the C-terminal position¹². The present study examines the relevance of this lipopeptide strategy to vaccination. We first evaluated the ability of lipopeptide constructs bearing simple lipid amino acid in the C-term position to reproducibly induce virus-specific CTL responses in a second viral model. Deres *et al.*¹¹ described how influenza

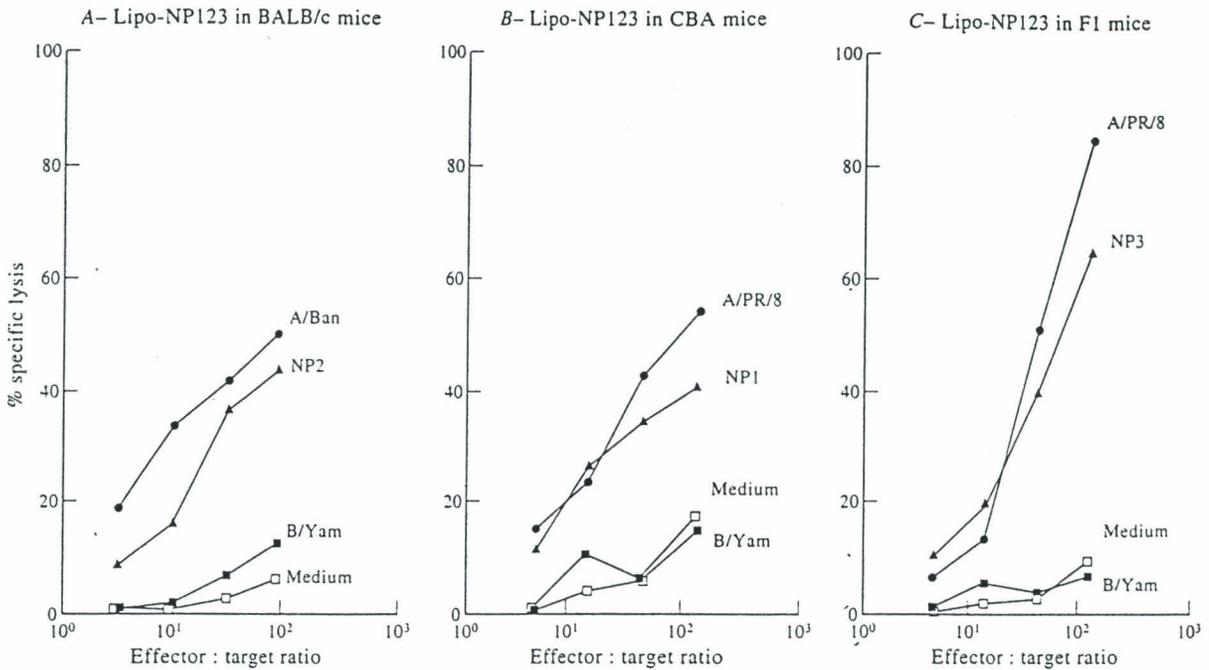


Figure 3 *In vivo* induction of influenza virus nucleoprotein-specific CTL with the construct Lipo-NP123. Spleen cells from BALB/c mice (A) immunized s.c. with Lipo-NP123 in saline were stimulated twice *in vitro* with NP2-pulsed BALB/c spleen cells. Identically immunized CBA or B/6×CBA F1 mice were stimulated twice *in vitro* with either NP1-pulsed CBA or NP3-pulsed B/6 spleen cells (B and C, respectively). Responding cells were tested for their cytolytic activity on P815 (A), RDM4 (B), or EL4 (C) target cells pretreated as indicated in the figure

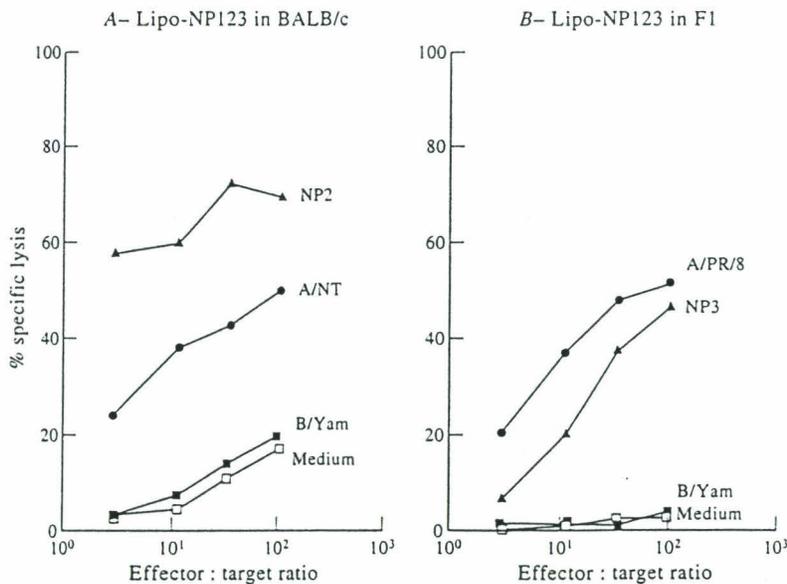


Figure 4 Memory CTL response in mice primed with Lipo-NP123. Spleen cells from BALB/c (A) and B/6×CBA F1 (B) mice immunized s.c. six months before with Lipo-NP123 were stimulated *in vitro* with NP2-pulsed BALB/c or with NP3-pulsed B/6 spleen cells, respectively. Responding cells were tested for their cytolytic activity on P815 (A) or EL4 (B) target cells pretreated as indicated in the figure

virus-specific CTL responses could be generated using a synthetic peptide containing a known H-2K^d-restricted CTL epitope of the nucleoprotein, provided that it was chemically linked to a built-in lipotriptide immunoadjuvant possessing polyclonal activator properties²⁰. Immunizing BALB/c mice with our NP2 derived lipopeptide, without adjuvant, we actually obtained a virus-specific response. Although the NP3 lipopeptide failed to induce a virus-specific CTL response into B/6 (H-2^b) mice, it succeeded in the H-2^{b^xk} hybrid haplotype, which allowed generation of a concomitant H-2^k-restricted T

helper cell response. These results suggest that T helper cells are required for efficient CTL induction at least in these cases and when using 11–15-mer long lipopeptides, as shown by others²¹. The necessity for T helper cells was also confirmed by the use of a lipopeptide construct that included the nine-mer NP2S sequence corresponding to the CD8 epitope within NP2 (see Table 1). Neither the peptide nor the lipopeptide NP2S induced T helper and CTL responses in BALB/c when injected s.c. even when the injections were done with IFA (unpublished results).

Table 1 Amino acid sequence of peptides and lipopeptides used

Name	Sequence ^{a,b}	H-2 class I restriction	H-2 class II restriction
NP1	SDYEGRLIQNSLTI	K ^k (Ref 13)	I-A ^k (Ref 17)
NP2	TYQRTRALVTG	K ^d (Ref 14)	I-A ^d (Ref 17)
Lipo-NP2	TYQRTRALVTG-Hda		
NP2S	TYQRTRALV	K ^d (Ref 15)	
NP3	IASNENMETMESSTL	D ^b (Ref 16)	I-A ^k (Ref 17)
Lipo-NP3	IASNENMETMESSTL-Hda		
NP123	SDYEGRLIQNSLTITYQRTRALVTGIASNENMETMESSTL	K ^k ,K ^d ,D ^b	I-A ^k , I-A ^d
Lipo-NP123	SDYEGRLIQNSLTITYQRTRALVTGIASNENMETMESSTL-Hda		

^aThe CTL determinant region is shown in bold type. ^bHda: Hexadecanoic acid

The conditions of immunization are important for generating persisting effectors, an essential consideration for the purposes of a vaccine. The results with long lipopeptides show that specific CTL responses persist for up to six months after the last injection, which is a long time in the life of a mouse. We thus confirm previous results obtained with lipopeptides by Schild *et al.*²² who injected their construct *i.v.*, but not by the more suitable *s.c.* route for human vaccination which we have used in our study. There is continuing debate about whether memory cell longevity is achieved by long cell life span²³, or whether maintenance of memory depends on sequestered Ag and/or other factors^{24,25}. Our results seem to favor the second hypothesis, if we assume that one of the properties of the lipid tail is to allow the peptide to persist longer by being attached to the cell membrane, as directly visualised on APC²⁶. However, it seems likely that the CD4⁺ T helper cell compartment is essential for retaining CTL activity, as has been shown in several viral systems²⁷⁻²⁹, and more recently in transgenic mice³⁰. Our results accord with these observations, since we were able to demonstrate the necessity of inducing specific T helper cells with lipopeptides, but not with free peptides injected in particular conditions under which memory CTL responses are not generated.

Since each individual has the potential to present a particular set of dominant epitopes for CTL recognition, due to the MHC presentation of these epitopes, an effective vaccine should allow generation of virus-specific CTL in as diverse a population as possible. The use of long synthetic sequences containing several CD8 and CD4 epitopes for human vaccination is therefore of particular interest. A 34-mer long sequence derived from the V3 loop of the HIV-1 ENV protein proved to be immunogenic in BALB/c mice¹². Several 24-mer long synthetic constructs from NEF or GAG proteins of the simian immunodeficiency virus (SIV) have also been tested on macaques³¹. However, not all the lipopeptides were immunogenic. One explanation for these results could be that, except in a very few cases, individual peptide/MHC interactions have not been defined in macaques because the MHC in these animals is not well understood. Furthermore, several epitopes in this study were chosen because they shared significant homologies with HIV sequences known to be epitopic in HIV-1 infected individuals, in contrast to the well defined epitopes described in the present study. We evaluated in mice a 'maximal' construction by testing a 41 amino acid long lipopeptide (Lipo-NP123) that included the sequences of NP1, NP2 and NP3 peptides (see Table 1) plus a C-terminal Hda residue. The immunogenicity of the NP2 peptide in BALB/c mice was completely re-

tained, even when the peptide lay within a 41-residue peptide. Both the N-terminal NP1 and C-terminal NP3 peptides were also immunogenic in CBA and B/6 × CBA F1 mice, respectively. Since all our constructs are modified at the C-terminal end of the peptide, this result suggests that the immunogenicity of the peptide does not depend on its distance from the lipophilic moiety. When the responses to the two external epitopes were tested in the same hybrid H-2^{b×k} haplotype, H-2^b restricted CTL activity was dominant over H-2^k restricted activity, suggesting that there was immunodominance within the NP123 sequence, as observed in F1 mice immunized with influenza-virus and restimulated with the virus *in vitro* (not shown). Thus, the lipopeptide construct and the whole internal nucleoprotein synthesized inside the cell seem to behave in a similar way, both for processing and MHC-class I presentation, although we still do not know if the lipopeptide gets into the cytoplasm of the cell.

Finally, lipopeptides seem not to be simply inducers of specific immune responses, but rather slow-releasing systems that can provide long-term immunity, which has a critical bearing on strategies for the development of effective vaccination against viral diseases. Due to conflicting results concerning the ability of CTL responses alone to protect against virus challenge after peptidic vaccination^{32,33}, studies are in progress to address this important question using our lipopeptide strategy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Hannoun for the gift of influenza viruses, the 'Agence Nationale de Recherche sur le Sida' for providing all the peptides used in the study; R. Magne, Marc Bossus for excellent technical assistance; and M. Pauchard for maintenance of the Cochin animal facility.

REFERENCES

- 1 Takahashi, H., Cohen, J., Hosmalin, A. *et al.* An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1988, **85**, 3105
- 2 Hany, M., Oehen, S., Schulz, M. *et al.* Anti-viral protection and prevention of lymphocytic choriomeningitis or of the local foot-pad swelling reaction in mice by immunization with vaccinia-recombinant virus expressing LCMV-WE nucleoprotein or glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* 1989, **19**, 417
- 3 Gotch, F.M., Hovell, R., Delchambre, M., Silvera, P. and McMichael, A.J. Cytotoxic T-cell response to simian immunodeficiency virus cynomolgus macaque monkeys immunized with recombinant vaccinia virus. *AIDS* 1991, **5**, 317

- 4 Shen, L., Chen, Z.W., Miller, M.D., Stallard, V., Mazzara, G.P., Panicali, D.L. and Letvin, N.L. Recombinant virus vaccine-induced SIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1991, **252**, 440
- 5 Zhou, J., McIndoe, A., Davies, H., Sun, X.Y. and Crawford, L. The induction of cytotoxic T-lymphocyte precursor cells by recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus type 16 L1. *Virology* 1991, **181**, 203
- 6 Aggarwal, A., Kumar, S., Jaffe, R., Hone, D., Gross, M. and Sadoff, J. Oral *Salmonella*: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+ cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* 1990, **172**, 1083
- 7 Aldovini, A. and Young, R. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 1991, **351**, 479
- 8 Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B., Putney, S., Germain, R.N. and Berzofsky, J.A. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 1990a, **344**, 873
- 9 Nogushi, Y., Nogushi, T., Sato, T. Priming for *in vitro* and *in vivo* anti-human T lymphotropic virus type 1 cellular immunity by virus-related protein reconstituted into liposome. *J. Immunol.* 1991, **146**, 3599
- 10 Arnon, R. and Horwitz, R.J. Synthetic peptides as vaccines. *Curr. Opin. Immun.* 1992, **4**, 449
- 11 Deres, K., Schild, H., Wiesmuller, K.H., Jung, G. and Rammensee, H.G. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 1989, **342**, 561-564
- 12 Martinon, F., Gras-Masse, H., Boutillon, C. Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant: immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J. Immunol.* 1992, **149**, 3416
- 13 Bastin, J., Rothbard, J., Davey, J., Jones, I. and Townsend, A. 1987. Use of synthetic peptides of influenza nucleoprotein to define epitopes recognized by class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **165**, 1508.
- 14 Bodmer, H.C., Pemberton, R.M., Rothbard, J.B. and Askonas, B.A. 1968. Enhanced recognition of a modified peptide antigen by cytotoxic T cells specific for influenza nucleoprotein. *Cell* **52**, 253
- 15 Rammensee, H.G., Falk, K. and Rotzschke, O. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 213
- 16 Townsend, A.R.M., Rothbard, J., Gotch, F.M., Bahadur, G., Wraith, D. and McMichael, A.J. 1986. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* **44**, 959
- 17 Perkins, D.L., Lai, M.Z., Smith, J.A. and Geffer, M.L. Identical peptides recognized by MHC class I- and II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 1989, **170**, 279-289
- 18 Merrifield, R.B. 1986. Solid phase synthesis. *Science*, **232**, 341
- 19 Healy, F., Sire, J., Gomard, E., Yssel, H., Jordan, B.R. and Levy, J.P. A study of functionally active amino-acids involved in the interaction of HLA-A2 and HLA-A3 molecules with cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1988, **141**, 2487
- 20 Bessler, W.G., Cox, M., Lex, A., Suhr, B., Wiesmüller, K.H. and Jung, G. Synthetic lipopeptide analogs of bacterial lipoprotein are potent polyclonal activators for murine B lymphocytes. *J. Immunol.* 1985, **135**, 1900
- 21 Fayolle, C., Deriaud, E. and Leclerc, C. *In vivo* induction of cytotoxic T cell response by a free synthetic peptide requires CD4+ T cell help. *J. Immunol.* 1991, **147**, 4069
- 22 Schild, H., Deres, K., Wiesmüller, K.H., Jung, G. and Rammensee, H.G. Efficiency of peptides and lipopeptides for *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.* 1991, **21**, 2649
- 23 Müllbacher, A. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J. Exp. Med.* 1994, **179**, 317
- 24 Oehen, S., Waldner, H., Kündig, T.M., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J. Exp. Med.* 1992, **176**, 1273
- 25 Gray, D. Immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* 1993, **11**, 49
- 26 Rouaix, F., Gras-Masse, H., Mazingue, C. Effect of a lipopeptidic formulation on macrophage activation and peptide presentation to T cells. *Vaccine* 1994, **12**, 1209
- 27 Robertson, M.N., Spangrude, G.J., Hasenkrug, K., Perry, L., Nishio, J., Wehrly, K. and Chesebro, B. Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. *J. Virol.* 1992, **66**, 3271
- 28 Mizuochi, T., Hügin, A.W., Morse III, H.C., Singer, A. and Buller, R.M.L. Role of lymphokine-secreting CD8+ T cells in cytotoxic T lymphocyte responses against vaccinia virus. *J. Immunol.* 1989, **142**, 270
- 29 Jennings, S.R., Bonneau, R.H., Smith, P.M., Wolcott, R.M. and Chervenak, R. CD4-positive T lymphocytes are required for the generation of the primary but not the secondary CD8-positive cytolytic T lymphocyte response to Herpes Simplex virus in C57BL/6 mice. *Cell. Immunol.* 1991, **133**, 234
- 30 Kirberg, J., Bruno, L. and Boehmer, H.V. CD4*8- help prevents rapid deletion of CD8* cells after a transient response to antigen. *Eur. J. Immunol.* 1993, **23**, 1963
- 31 Bourgault, I., Chirat, F., Tartar, A., Lévy, J.P., Guillet, J.G. and Venet, A. Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. *J. Immunol.* 1994, **152**, 2530
- 32 Gao, X.M., Zheng, B., Liew, F.Y., Brett, S. and Tite, J. Priming of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes *in vivo* by short synthetic peptides. *J. Immunol.* 1991, **147**, 3268
- 33 Schulz, M., Zinkernagel, R.M. and Hengartner H. Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991, **88**, 991-993

Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for *in vivo* induction of virus-specific CTL

Benoît Deprez*, Jean-Pierre Sauzet†, Christophe Boutillon*, Frédéric Martinon†, André Tartar*, Christian Sergheraert*, Jean-Gérard Guillet‡, Elisabeth Gomard† and Hélène Gras-Masse*‡

We have previously shown that virus-specific CTL responses can be elicited in vivo by injecting, without adjuvant, 12–40 amino acid-long peptides, modified in C-terminal position by a simple lipidic amino acid. In this paper, we have studied the chemical accessibility, and the ability to induce in mice a CTL response, of a series of lipopeptides derived from the HIV-1 env (312–327) or (302–335) sequences. We showed that a single modification of these peptides by a lipidic amino acid, preferably in C-terminal position, results in the ability to reproducibly induce, without adjuvant, a relevant CTL response. No clear discrimination appeared concerning the nature of the lipidic modification. Our findings indicate that modification of a relatively long peptide by a N^ε-palmitoyl-L-Lysylamide can be achieved by conventional methods of synthesis and characterization, offering the possibility to develop low-cost synthetic vaccines in models in which the CTL component is of importance. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd.

Keywords: Cytotoxic T lymphocytes; synthetic vaccines; lipopeptides

Much of the effort to combat AIDS has focused on the development of a vaccine. Although ten years after its identification much is known about the structure of HIV-1, and the manner in which it interacts with the host, a vaccine remains elusive. Stimulating the production of neutralizing antibodies appeared not to be sufficient to achieve protection, mainly because of the high variability of HIV-1, particularly in those regions responsible for binding neutralizing antibodies.

In this context, attention now appears to be focusing on the stimulation of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) by vaccine components. CTLs, which are specific for short peptide fragments presented at the surface of infected cells by major histocompatibility complex (MHC) class-I molecules, are able to lyse infected cells with great efficiency. One of the major advantages of CTLs is that they may recognize epitopes from virtually any viral protein, including the less variable regulatory or core structural proteins. In terms of vaccine development, CTLs are unfortunately difficult to stimulate, due to the requirement of endogeneous

processing of intracellularly synthesized proteins; such a processing normally occurs when a cell is actively infected with a replicating virus. Therefore one way to achieve a CTL response is to infect with a relatively harmless virus expressing HIV genes. However, recent experimental data showed that sometimes exogenous antigens can prime CTL response *in vivo*, and these observations have now found a possible explanation with the recent discovery of a phagosome-to-cytosol pathway for presentation of exogenous antigens on MHC class I molecules¹.

A few years ago, the use of chemical constructs associating a complex lipopeptidic immunoadjuvant to CTL epitopes appeared to be an effective method of diverting peptides into the endogeneous processing pathway to stimulate CTLs: chemically defined modification of a peptide by a built-in immunoadjuvant lipopeptide (tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserylserine: Pam₃Cys-Ser-Ser) was described as a reproducible way of stimulating CTL response *in vivo*². More recently, we have also obtained a relevant virus-specific CTL response by immunizing mice with a HIV-1 envelope, V3-derived 16-mer peptide covalently linked to another lipopeptide immunoadjuvant (trimexautide) without mitogenic properties³.

However, the need for immunoadjuvant properties does not appear as a prerequisite for CTL induction: we have also described the modification of a synthetic peptide by a C-terminal α -aminohexadecanoic acid as another possibility for stimulating, *in vivo*, and without

*Laboratoire de Chimie des Biomolécules, Université de Lille II, URA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille cédex, France. †Laboratoire d'immunologie des interactions cellulaires et moléculaires, INSERM U 152, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 27 rue du Fbg. Saint-Jacques, 75014 Paris, France. ‡To whom correspondence should be addressed. (Received 9 May 1995; revised 3 October 1995; accepted 5 October 1995)

the need of immunoadjuvant, both CD4+ T-cell help and CTL response in mice, using i.p. or s.c. injection of V3-derived 16-mer or 34-mer lipopeptides⁴.

In this paper, we have compared, in terms of ability to induce CTLs, several constructs obtained by modification with different simple lipidic amino acids introduced at the C-terminal and/or the N-terminal part of two model peptides: a 16-mer peptide (V3S; sequence 312–327) containing known MHC class I⁵ and class II⁶ restricted epitopes, and a 34-mer peptide (V3L; sequence 302–335) derived from the third hypervariable domain of the gp160 envelope glycoprotein (the “V3 loop”) of HIV-1 BRU. The different constructs were compared with reference to our early synthesized compounds modified by an α -amino hexadecanoic acid, and to a compound obtained by N-terminal introduction of the Pam₃Cys-Ser-Ser immunoadjuvant lipopeptide, analog to the compound described by Deres *et al.*²

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of the lipophilic amino acids

Synthesis of D,L- α -aminohexadecanoic acid (Hda). 2-Bromohexadecanoic acid (Janssen)(10 g, 30 mmol) and 32% aqueous ammonia (100 ml) were placed into an autoclave. The reaction mixture was shaken at 130°C for 18 h. After cooling to room temperature, the precipitate was filtered and washed twice with water (2 × 100 ml), ethanol (100 ml), and recrystallized from boiling acetic acid. Yield 4.56 g (46%). Rf = 0.82 in butanol/acetyl acetate/acetic acid/water 1/1/1/1) m.p.=236–238°C (decomp.).

Synthesis of N-tert-butylloxycarbonyl-D,L- α -aminohexadecanoic acid (Boc-Hda-OH). Into a 250 ml round bottom flask were placed α -aminohexadecanoic acid (3 g, 9.1 mmole) and 100 ml of DMF (*N,N*-dimethylformamide). To this suspension were added 6 ml of a 40% solution of trimethylbenzylammonium hydroxyde in methanol (Janssen). The mixture was stirred for 12 h, and DMF was evaporated under reduced pressure. The resulting white slurry was dispersed in a solution containing *tert*-butanol (30 ml), water (36 ml), and 1 M sodium hydrogen carbonate (6 ml). Di-*tert*-butyl pyrocarbonate (Janssen) (9.8 g, 45 mmole) was added, and the pH was maintained between 9 and 10 by additions of 1 M sodium carbonate for 18 h. *Tert*-butanol was then evaporated in vacuum, and the resulting oily residue was taken up with 100 ml of water, and acidified to pH 4 with 1 N aqueous HCl. The mixture was extracted twice with ethyl acetate (100 ml). The organic layers were washed with 10⁻⁴ M aqueous HCl (100 ml), dried over sodium sulfate, and evaporated in vacuum. The resulting oily residue crystallized spontaneously at room temperature. Yield: 2.7 g (80%). m.p.=75°C. Rf = 0.6 (chloroform/methanol/acetic acid, 9/1/0.1).

Synthesis of Fmoc-L-lysine[3- β -(carboxymethoxy)cholest-5-ene]: Fmoc-lys(chol)-OH. The *N*-hydroxy-succinimide ester of 3- β -(carboxymethoxy)cholest-5-ene [830 mg (1.53 mmoles)], obtained as previously described⁷, was added to a solution of 746 mg (1.53 mmoles) of Fluoronemethyloxycarbonyl (Fmoc)-L-Lysine trifluoroacetate, and 0.214 ml of triethylamine

in 5 ml of methylene chloride. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After addition of methanol (5 ml), and methylene chloride (20 ml), the reaction mixture was washed with 10⁻² M aqueous HCl. The organic layer was dried, and evaporated to give crystals. Yield: 0.88 g (73%). m.p.=89°C. Rf=0.5 (methylene chloride/methanol, 9/1), m/z: 795 [M+H]⁺.

Peptide synthesis

The sequence of peptide 312–327 (V3S) was: Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys. The sequence of peptide 302–335 (V3L) was: Thr-Arg-Pro-Asn-Asn-Asn-Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile-Gln-Arg-Gly-Pro-Gly-Arg-Ala-Phe-Val-Thr-Ile-Gly-Lys-Ile-Gly-Asn-Met-Arg-Gln-Ala-His.

All peptides except the Pam₃Cys-Ser-Ser- and cholesteryl-modified analogs were synthesized using the conventional solid-phase “Boc-benzyl strategy”⁸ in an automated Applied Biosystem 430A peptide synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, USA); *t*-Boc (*tert*-butyloxycarbonyl)-protected amino acids were purchased from Propeptide (Vert-Le-Petit, France); side chain protections were as follows: arginine (tosyl), threonine (benzyl ether), tyrosine (2,6-dichlorobenzyl ether); resins for solid-phase synthesis were from Applied Biosystems, Foster City, USA. Peptides possessing a carboxylic C-terminal end were synthesized on *N-t*-Boc-Gly-phenyl-acetamidomethyl resin, while peptides possessing a carboxamide C-terminal end were synthesized on a methylbenzhydrylamine resin.

N-terminal acetylation or succinylation (AcHda-V3S or SucHda-V3S) were performed on the peptidyl resin: after trifluoroacetic acid (TFA)-deprotection of the terminal Boc group and neutralization, the acyl group was introduced using acetic or succinic anhydride, respectively.

An additional lysine residue was incorporated at the C- and/or N-terminal extremities for the synthesis of palmitoyl-modified analogs, with an orthogonal protecting group for the ϵ -NH₂ group. Boc-L-Lysine(Fmoc) (Novabiochem, EMA, Meudon, France) was used; immediately after introduction of the protected lysine, the Fmoc group was removed by 20% piperidine, and the palmitoyl chain was introduced by activation of palmitic acid by the 1-benzotriazoloyloxy-tris-(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) reagent (Richelieu Biotechnologies, Ste-Hyacinthe, Quebec, Canada)⁹.

After hydrogen fluoride final deprotection and cleavage from the resin for 2 h at 0°C, in a Teflon-Kel F apparatus (Asti, Courbevoie, France), the peptides were partially purified by two consecutive trifluoroacetic acid/ether precipitations, and lyophilized.

Tripalmitoyl-S-glyceryl-cysteinyl-seryl-serin (Pam₃Cys-Ser-Ser-) was a kind gift from Professor G. Jung (Tübingen, Germany). Pam₃Cys-Ser-Ser- and cholesteryl-modified analogs were synthesized using the Fmoc-*t*Bu chemistry¹⁰. Fmoc-protected amino acids were purchased from Novabiochem (EMA, Meudon, France); side chain protections were as follows: arginine (pentamethylchromansulfonyl), threonine (*t*-butyl ether), tyrosine (*t*-butyl ether). Peptides Pam₃Cys-Ser-Ser-V3S and Lys(Chol)V3S, possessing a carboxylic C-terminal end, were synthesized on a Fmoc-Lys(Boc)-Wang resin (Novabiochem, Meudon, France), while peptide

V3S-Lys(Chol), possessing a carboxamide C-terminal end, was synthesized on a Rink amide resin (4-(2',4'-dimethoxy-phenylaminomethyl)-phenoxyethyl resin) (Novabiochem, Meudon, France). Pam₃Cys-Ser-Ser was introduced at the N-terminal end of the peptide by BOP activation. Final deprotection and cleavage were performed in TFA:thioanisole:water:ethanedithiol (85:5:5:5), for 3 h at room temperature. Peptides were partially purified by TFA-ether precipitations as above.

Reversed-phase preparative HPLC

Unmodified peptides and peptides modified by a single lipophilic amino acid were purified by reversed-phase preparative HPLC. Crude lipopeptides (50 mg per run) were solubilized in formic acid (0.5 ml) and water (2 ml), and applied onto a Vydac C4 7 μ 300 Å column (11 \times 250 mm). Solvent system was: solvent A 0.05% TFA in water; solvent B: 0.05% TFA in acetonitrile/water (80/20), flow rate: 2.5 ml min⁻¹. The linear gradient used was from 10 to 100% solvent over 100 min. The column was washed during 10 min with isopropanol between each purification run.

Peptides characterizations

Amino acid analysis. Hydrolysis of the peptides was performed with 6N HCl/phenol (10/1) at 110°C for 24 h in evacuated sealed tubes. Amino acids were quantitated on a Beckman amino acid analyzer model 7300 with ninhydrine detection. Amino acids composition were as expected. Lipophilic amino acids were not determined with this method.

Mass spectrometry. The mass spectra were recorded on a Bio Ion 20 plasma desorption mass spectrometer, Bio Ion AB, Uppsala, Sweden. Spectra were accumulated for 10⁷ fission events corresponding to approximately 180 min. Samples were analysed using nitrocellulose targets, prepared by the spin drying technique using 50–100 μ l of a 2 mg ml⁻¹ nitrocellulose solution in acetone, applied onto a Mylar foil (1 cm i.d.). Samples were dissolved in water (1 mg ml⁻¹); 50 μ l was applied on the nitrocellulose target by the spin drying technique. Mass determination was possible only for unmodified peptides, or peptides modified by a single lipophilic amino acid, after RP-HPLC purification. Results were as follows: V3S: [M+H]⁺ calc. 1769.1, found 1771; Ac-V3S-NH₂: calc. 1810.2, found 1810.1; Pam₃Cys-Ser-Ser-V3S: calc. 2835.6, found 2836.4; V3S-Hda: calc. 2023.5, found 2023.1; Hda-V3S: calc. 2024.5, found 2024; AcHda-V3S: calc. 2066.6, found 2066; V3S: calc. 1769.1, found 1771; SucHda-V3S: calc. 2124.6, found 2124.2; V3S-Lys(Pam): calc. 2134.7, found 2135.2; V3S-Lys(Chol): calc. 2343, found 2342; Lys(Chol)-V3S: calc. 2390, found 2391; V3L-Hda: calc. 4098.4, found 4100.7; V3L-Lys(Pam): calc. 4212.1, found 4215.6.

Analytical HPLC. Ten microliters of peptide solutions (1 mg ml⁻¹) were applied onto a Vydac C4 5 μ 300 Å column (250 \times 4.6 mm) in a Shimadzu system. Solvent A was 0.05% TFA in water, solvent B was 0.042% TFA in acetonitrile–water (80/20).

Priming of mice and generation of CTL

BALB/c mice (H-2^d) were primed as described⁴, subcutaneously with 50 nanomoles of free peptide or lipopeptide in PBS, or i.v. with 10⁷ p.f.u. of Vac-*env*. Three weeks later, mice were boosted under identical conditions. Fifteen days after the last injection, spleens were removed for *in vitro* lymphocyte stimulation. Splenocytes from naive or primed mice were cultured for 6 days in 24-well plates at 5 \times 10⁶ cells per well in 2 ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplemented with 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine, nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES (*N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid), 2.5 mg ml⁻¹ amphotericin B, 50 μ M 2-mercaptoethanol and 10% heat-inactivated FCS (foetal calf serum) (Flow Laboratories, Irvine, UK) (culture medium) containing 3–5 μ M synthetic V3S peptide.

Viruses

The vaccinia virus recombinant for the *env* and *gag* genes of HIV-1-BRU (Vac-*env* and Vac-*gag*) (Transgène, Strasbourg, France) were kindly provided by the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS).

Cytotoxicity assays

P815 (H-2^d, DBA/2) cells (1–2 \times 10⁶) in 200 μ l culture medium were labeled with 100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ (CEA, Gif sur Yvette, France) for 1 h at 37°C. After two washings, 3000 labeled targets and serial dilutions of effector cells were incubated in 200 μ l of culture medium in round-bottomed microtiter plates. Synthetic peptides were included in the appropriate assays at 3 μ M. In the case of virus-infected targets, cells were incubated overnight at 37°C with 10 p.f.u. per cell of recombinant vaccinia virus as described⁴. The cytotoxicity assay was terminated after a 4 h incubation at 37°C, and 100 μ l of supernatant were harvested and specific lysis was determined as: % specific lysis = 100 \times (experimental – spontaneous release)/(half total ⁵¹Cr incorporated – spontaneous release). In all experiments, spontaneous release in the absence of effector cells was <20% of maximum release.

RESULTS

Selection of the modifying groups

The first function of the tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserylseryl- (Pam₃Cys-Ser-Ser-) group selected by G. Jung and his co-workers is to anchor a widespread class of proteins produced by *E. coli* to bacterial membranes. When we engaged this work, we had no idea of the mechanism of action of Pam₃Cys-Ser-Ser-derived peptides, and we hypothesized that the membrane anchoring functionality, frequently associated with an important role in the regulation of cellular functions, was of importance. We thus selected several structures which would presumably possess this function, but with a smaller size, to preserve a minimal solubility, compatible with handling and sterilizing filtration of solutions.

Examination of the different post-translational modifications which allow membrane association of proteins

indicated that a single lipidic chain is able to anchor even large proteins. N-terminal modification by an alkyl chain as small as a myristoyl group attached on a glycyl residue is sufficient to anchor cytosolic proteins to membranes. Another frequent post-translational modification of proteins consists in the isoprenylation or palmitoylation of a cysteinyl residue in the carboxy terminal part of a protein via a thioether bond, or a thioester bond, respectively¹¹. Contrary to isoprenylation, palmitoylation does not appear to require a consensus sequence, and is chemically accessible.

We thus engaged the synthesis of compounds related to the palmitoyl modification, in which the chemically unstable thioester bond is replaced by a stable amide bond. Our first idea was to derivatize the alkoxy chain by introduction of an α -amino group, and we synthesized the α -amino-hexadecanoic acid (Hda, or α -aminopalmitic acid), an exotic amino acid which could be introduced in any part of the backbone using conventional methods for peptide synthesis.

Another possibility for modifying any selected part of a peptide was the use of an enantiomerically pure lysyl residue, derivatized on its side chain by a palmitoyl group. Another chemically accessible modification of lysine was introduction in N^ε position of a cholesteryl group, attached on its polar end (the 3- β OH group) via an acetyl spacer: such modified amino acids would thus contain exclusively physiological components. The different lipidic amino acids used in our constructs are represented in Figure 1.

Peptide synthesis and characterization

The α -D,L-amino-hexadecanoic acid (Hda) was obtained by nucleophilic substitution of α -D,L-bromohexadecanoic acid by ammonia. As this amino acid was obtained in a racemic form, the corresponding peptides were obtained and tested as mixture of diastereoisomers. Fmoc-Lys(Chol) and peptide modified by a Lys(Pam) residue were obtained in non-racemizing conditions by acylation of the N^ε protected L-lysine, and were thus enantiomerically pure.

All peptides were soluble in water (>2 mg ml⁻¹), except the heavily lipidated forms of the short peptide (PamLys(Pam)-V3S-Hda, Hda-V3S-Hda), which yielded turbid suspensions. These solutions or suspensions were not filtrated before *in vivo* priming of animals.

All soluble peptides, except Hda-V3L-Hda and PamLys(Pam)-V3L-Hda, were purified by RP-HPLC. Purification yields after RP-HPLC of soluble peptides were between 38 and 55% for the non-lipidic form V3S and Ac-V3S-NH₂, and between 32 and 38% for the V3S peptides modified by a single Hda or palmitoyl-lysine residue. Resolution of the diastereoisomers contained in the Hda-V3S peptide could be obtained by this method, with a yield of 10 and 12% for the first and the second collected peak, respectively. The V3S-Lys(Chol) and Lys(Chol)-V3S peptides were obtained with lower yields (5 and 10.5%, respectively). due to the lability of the 3 β O-steroid ether towards the prolonged acidic cleavages that were necessary to deprotect the arginine residues from the Pmc groups. Purification yields for the longer sequences were 17.5% for the V3L peptide, 5% for the V3L-Hda, and 8% for the V3L-Lys(Pam) peptide.

Homogeneity of the purified peptides was checked by analytical RP-HPLC. Lipopeptides, even with long

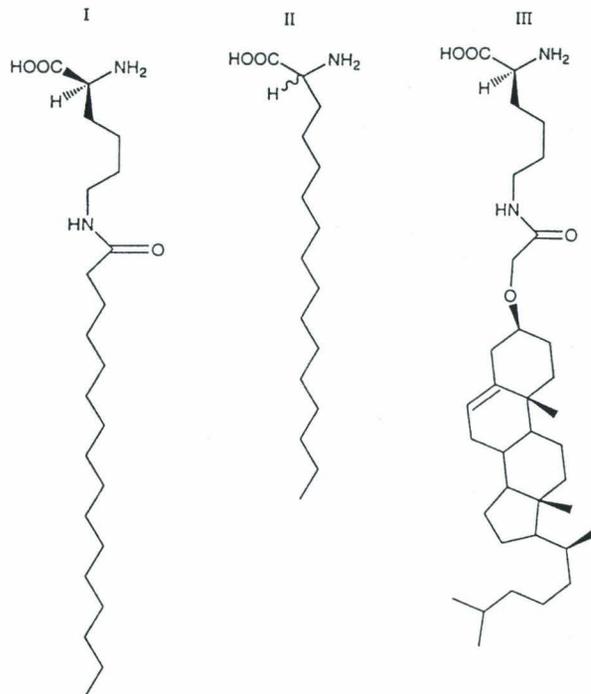


Figure 1 Structures of the lipophilic amino acids used in our constructs. I: N^ε-palmitoyl-L-lysine: Lys(Pam), II: α -amino-hexadecanoic acid: Hda, and III: N^ε-(3 β -(carboxymethoxy)cholest-5-ene)-L-lysine: Lys(Chol)

sequences, modified by the L-lysine-derived lipophilic amino acids eluted as a symmetric peaks, which can be used to determine their purity. Conversely, peptides modified by the α -amino-hexadecanoic acid eluted as shouldered peaks resulting from the presence of diastereoisomers, although the presence of impurity could not be excluded from the chromatographic profile. In the case of the Hda-V3S peptide, the doublet corresponding to the diastereoisomers was observed, assessing the resolving power of our analytical procedures. Nevertheless, in our conditions, RP-HPLC resolution was not possible with the C-terminally modified V3S-Hda or V3L-Hda.

Purified peptides had the expected amino acid composition, as determined by amino acid analysis after total acid hydrolysis. Incorporation of the lipidic component was assessed by molecular mass determination, determined by Plasma Desorption Mass Spectrometry for mono-substituted peptides, after RP-HPLC purification. Mass determination was not possible for peptides PamLys(Pam)-V3S-Hda, Hda-V3S-Hda, PamLys(Pam)-V3L-Hda, and Hda-V3L-Hda. As these peptides were obtained by N-terminal elongation of the same peptidyl resin than the analog V3S-Hda and V3L-Hda, it was assumed that the incorporation of the C-terminal lipidic was effective after monitoring using a qualitative ninhydrine test.

In vivo induction of virus-specific CTL response. Criteria of positivity

The criteria retained in this paper have been described in our first report⁴. Briefly, the capacity of the different peptide constructs to induce, without any adjuvant, a virus-specific CTL response was evaluated with reference to the results obtained when immunizing with the living *Vac-env* recombinant virus, i.e. according to the

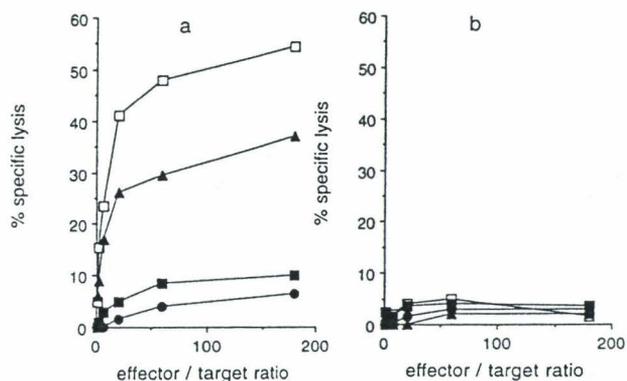


Figure 2 Cytolytic activity of cell lines derived from BALB/c (H-2^d) mice: animals were primed s.c. with 50 nanomoles of V3SHda (panel a) in saline, or 50 nanomoles of V3S peptide alone (panel b). Three weeks later, they were boosted in identical conditions. Fifteen days after the last injection, spleens were removed for *in vitro* lymphocyte stimulation with peptide V3S. After a single *in vitro* stimulation, cell lines were tested for their capacity to lyse P815 target cells pretreated with the peptide V3S (open squares), P815 target cells infected with *Vac-env* (closed triangles) or with a virus expressing an irrelevant protein (*Vac-gag*: closed squares), or in culture medium alone (closed circles)

delay before detection of cytolytic activity (<day 14), and the ability to lyse peptide-pulsed and virus-infected target cells.

All mice were individually tested. Representative experiments are shown in *Figure 2*: CTL activity, able to lyse specifically both peptide-pulsed and *Vac-env*-infected P815 target cells, could be detected in a Balb/c mouse after subcutaneous priming with 50 nanomoles of the V3S-Hda peptide, in saline, followed by a booster injection 15 days later under identical conditions (*Figure 2a*).

The efficiency of our different constructs was thus expressed in terms of the relative number of animals in which a peptide-specific CTL activity was observed after subcutaneous priming with 50 nanomoles of a given compound. In its great majority (49/53), this specific activity was also verified and recovered on *Vac-env* infected target cells. By contrast, we were unable to detect CTL activity in any of the 8 mice immunized in the same conditions with the unmodified V3S peptide (*Figure 2b*).

CTL induction: comparative efficiency of the lipopeptides

In our conditions, CTL activity was exceptionally detected in the animals immunized with the non-lipidic forms of peptides V3S, and V3L (*Table 1*): the simple protection towards the degradation by exopeptidases, by acetylation and amidation of the N and C-terminal extremities, was not sufficient to confer CTL-immunogenicity (a significant CTL activity could be detected in only 1 of the 5 mice immunized with the Ac-V3S-NH₂ peptide).

As shown from results presented in *Table 2–4* and *Table 5*, several lipopeptide constructs were endowed of a high potency; for example, a CTL response was observed in 6 of the 9 mice immunized with the V3S-Lys(Pam) lipopeptide, or in 10 of the 15 mice immunized with the V3S-Hda lipopeptide injected in PBS.

Peptides modified at a single extremity by a lipidic amino acid can induce a virus specific CTL response in

most cases: this result is clearly reproducible when the C-terminal extremity was modified by a Lys(Pam)-NH₂ residue, an α -aminohexadecanoylamide residue, or with a Lys(Chol)-NH₂ residue (*Table 2*) (due to the low yields of synthesis and purification, only 2 mice were immunized with the Lys(Chol)-derived constructs).

Interestingly, modification of the long V3L peptide by a single lipidic amino acid (Hda-NH₂ or Lys(Pam)-NH₂) is sufficient to confer CTL immunogenicity (*Table 3*).

Results obtained with N-terminally modified constructs are less clear (*Table 4*). As expected, the Pam₃Cys-Ser-Ser-V3S construct was active, but CTL were observed in only 1 of the 12 mice immunized with the AcHda-V3S or SucHda-V3S peptides, modified by a N-terminally blocked α -aminohexadecanoic acid residue. Four of the 11 animals immunized with the Hda-V3S peptide were positive. The Lys(Chol)-V3S construct, modified by an acetylated lipidic amino acid, was active in both immunized mice.

Modification of both extremities of the peptides is associated with a diminution of solubility. The peptides Hda-V3S-Hda, PamLys(Pam)-V3S-Hda, and PamLys(Pam)-V3L-Hda showed little or no activity (*Table 5*). All these peptides were almost insoluble (solubility: 50–70 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and were injected as turbid suspensions, containing ill-defined aggregate forms of the peptide. Insolubility rather than the ratio lipidic charge versus length appeared critical: the three palmitoyl chains present in the (fairly soluble) Pam₃Cys-Ser-Ser-V3S peptide were compatible with CTL immunogenicity, although in this case, the activity of the construct cannot be explained only by lipophilicity (the well known intrinsic immunoadjuvant properties of the Pam₃Cys-Ser-Ser moiety are presumably involved in the overall activity of this construct).

The Hda-V3L-Hda peptide was able to induce CTL activity in the three mice tested (*Table 5*). The better immunogenicity of this compound compared with the Hda-V3S-Hda peptide may rely on the existence in the V3L sequence of a stronger CD4 T helper epitope, as already mentioned in our first paper⁴. Moreover, contrary to the Hda-V3S-Hda peptide, this compound is fairly soluble (>1 mg ml⁻¹), but the presence of two Hda residues needlessly complicates (as the monosubstituted compound is also active) the purification steps by reversed-phase chromatography.

DISCUSSION

From these results, it appears that a single modification of a relatively long peptide by a lipidic amino acid, preferably in C-terminal position, results in the ability to reproducibly induce, without immunoadjuvant, a relevant virus-specific CTL response. The potency of this approach was demonstrated using a 41-mer chimeric lipopeptide derived from the nucleoprotein of influenza, and resulting from the colinear synthesis of three sequences containing three CTL epitopes, each restricted to a different haplotype: we evidenced that, provided a concomitant stimulation of specific T helper cell response was achieved, a CTL response could be elicited to all three epitopes¹². We have also been able to elicit SIV-specific CTL in 7 of 12 macaques subcutaneously immunized in the presence of IFA by a cocktail of seven 23- to 36-residues lipopeptides derived from

Table 1 CTL responses in recombinant *Vac-env* infected mice and in mice immunized with non-lipidic forms of peptides V3S and V3L

Denomination	Construct	Positive over total	P815		P815+V3		P815+VacENV		P815+VacGAG	
			100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1
<i>Vac-env</i> V3S	Recombinant virus H-312-327-OH	0/8	5	3	40	34	55	48	23	19
			8	10	<2	<2	nt	nt	nt	nt
			7	15	5	15	nt	nt	nt	nt
			10	8	10	5	nt	nt	nt	nt
			<2	<2	2	<2	nt	nt	nt	nt
			3	<2	2	<2	6	3	5	2
			5	2	8	3	8	5	6	2
			2	<2	10	2	9	6	7	5
			10	5	12	8	15	9	16	9
			4	<2	<2	<2	2	<2	<2	<2
Ac-V3S-NH ₂	Ac-312-32-NH ₂	1/5	35	27	90	89	68	55	42	32
			<2	2	8	5	4	2	5	6
			10	5	15	7	18	9	15	3
			5	6	5	2	<2	5	2	<2
			6	2	13	5	nt	nt	nt	nt
V3L	H-302-336-OH	1/7	5	2	6	3	nt	nt	nt	nt
			3	2	6	3	7	4	8	2
			17	16	50	75	40	28	25	11
			<2	<2	<2	<2	3	<2	<2	<2
			7	2	5	3	10	9	8	<2
			5	4	12	8	15	7	17	8

*Number of positive mice over the number of mice tested (mice were considered positive when the specific lysis on peptide-pulsed target cells was >10%, compared to untreated target cells, at both 100:1 and 20:1 E:T ratio). 312-327: IRIQRGPGRAVFTIGK. 302-355: TRPNNNTRKSIRIQRGPGRAVFTIGKIGNMRQAH

Table 2 Immunogenicity for CTL of C-term modified V3S peptide

Denomination	Construct	Positive over total	P815		P815+V3		P815+VacENV		P815+VacGAG	
			100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1
V3S-Hda	H-312-327-Hda-NH ₂	10/15	<2	2	4	<2	nt	nt	nt	nt
			2	<2	30	12	23	10	<2	<2
			10	5	40	22	nt	nt	nt	nt
			2	<2	22	11	nt	nt	nt	nt
			2	2	66	43	nt	nt	nt	nt
			2	12	4	<2	nt	nt	nt	nt
			18	6	40	25	20	12	10	<2
			8	4	40	18	15	12	5	<2
			5	3	17	13	16	12	5	2
			20	6	18	6	17	3	19	3
			5	4	<2	<2	<2	<2	<2	<2
			10	2	93	86	55	40	18	8
			8	4	65	62	40	31	<2	<2
			2	2	35	17	15	11	<2	<2
			7	4	15	6	4	<2	<2	<2
V3S-Lys(Pam)	H-312-327-Lys(Pam)-NH ₂	6/9	<2	<2	2	<2	3	<2	2	<2
			2	<2	26	10	18	12	4	2
			<2	<2	55	30	20	10	<2	<2
			<2	<2	10	5	6	6	<2	<2
			<2	2	15	12	14	10	2	<2
			<2	<2	<2	<2	5	2	5	<2
			3	2	36	25	29	20	9	2
			5	2	41	32	27	12	2	<2
			7	5	30	15	20	13	<2	<2
			6	2	23	12	19	13	<2	<2
V3S-Lys(Chol)	H-312-327-Lys(Chol)-NH ₂	2/2	5	<2	28	15	17	12	<2	<2

*See Table 1

non-structural proteins of SIV¹³: these results showed that simple peptide-based constructs could allow to elicit in unselected animals a CTL response. This approach may thus be worth considering in the context of a vaccination strategy.

This addresses the question of simplicity and low cost of the proposed peptide-construct, together with a minimal toxicity.

In the context of a vaccination strategy, the possibility of development of lipopeptides containing the α -aminohexadecanoic acid would be unfavoured, due to the presence of an uncontrolled asymmetric α -carbon, yielding diastereoisomeric peptides. Complete study of such compounds would require resolution of both diastereoisomers, or enantioselective synthesis of the lipidic amino acid, and separate evaluation of biological

Table 3 Influence of C-term modification on V3L peptide immunogenicity

Denomination	Construct	Positive over total	P815		P815+V3		P815+VacENV		P815+VacGAG	
			100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1
V3L-Hda	H-302-335-Hda-NH ₂	5/5	7	3	23	14	nt	nt	nt	nt
			5	2	54	43	30	22	6	3
			2	<2	39	27	25	12	2	<2
			<2	2	28	15	20	10	3	<2
			3	<2	40	25	22	14	5	4
V3L-Lys(Pam)	H-302-335-Lys(Pam)-NH ₂	14/22	2	3	45	25	17	13	5	2
			4	<2	35	25	19	12	8	2
			8	3	32	14	25	12	7	<2
			7	<2	47	11	30	20	9	7
			15	5	35	15	37	15	11	4
			8	<2	45	15	25	10	15	<2
			6	4	61	38	15	12	2	<2
			<2	<2	57	42	27	20	<2	<2
			18	10	72	51	40	21	10	5
			15	6	60	37	26	17	6	<2
			20	6	83	70	40	35	12	7
			22	13	80	68	46	28	17	9
			12	7	65	55	45	30	6	3
			25	16	65	55	43	28	17	9
			5	<2	10	2	10	2	22	10
			9	<2	28	10	12	7	18	11
			2	<2	<2	2	3	<2	4	2
			<2	<2	4	3	5	2	3	<2
			13	<2	13	<2	12	<2	9	3
			10	5	22	3	15	4	15	11
10	4	20	<2	15	<2	8	2			
10	<2	10	<2	6	<2	6	10			

*See Table 1

Table 4 Immunogenicity for CTL of N-term modified V3S peptide

Denomination	Construct	Positive over total	P815		P815+V3		P815+VacENV		P815+VacGAG	
			100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1
Pam ₃ Cys-Ser-Ser-V3S	Pam ₃ Cys-Ser-Ser-312-327-OH	2/2	8	<2	23	12	21	12	5	2
			5	<2	40	28	30	15	2	<2
Hda-V3S	H-Hda-312-327-OH	4/11	35	18	96	84	60	43	36	23
			8	<2	19	11	13	<2	<2	<2
			<2	<2	15	7	15	3	12	3
			<2	<2	<2	<2	7	<2	5	<2
			10	5	25	10	14	3	7	2
			5	<2	16	4	9	<2	4	<2
			10	12	14	6	12	7	13	3
			4	<2	5	7	4	7	<2	<2
			28	17	82	66	54	35	20	18
			19	12	91	65	51	41	29	20
AcHda-V3S	Ac-Hda-312-327-OH	1/6	8	3	22	13	18	10	6	<2
			<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
			<2	<2	<2	<2	3	<2	10	<2
			5	<2	16	4	9	<2	4	<2
			10	2	10	4	14	5	8	2
SucHda-V3S	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -CO-Hda-312-327-OH	0/6	3	4	4	4	3	4	<2	<2
			5	2	58	29	22	14	4	4
			<2	<2	2	<2	3	<2	3	<2
			7	7	8	5	8	6	13	3
			5	3	<2	<2	<2	2	<2	<2
Lys(Chol)-V3S	AcLys(Chol)-312-327-OH	2/2	<2	2	10	9	15	8	17	5
			2	6	8	7	13	7	9	7
			<2	5	7	10	8	6	12	8
			2	<2	28	15	20	11	3	<2
			5	<2	32	19	18	12	5	2

*See Table 1

activities and toxicities. This proved to be a difficult task, due to the particular physico chemical properties of these compounds. We thus explored the possibility of modifying an antigenic peptide by other simple lipidic components, introduced on the side chain of an enantiomerically pure amino acid.

No clear discrimination appeared concerning the nature of the lipidic modification: a simple lysine residue modified on its side chain by a cholesteryl derived synthon, or a palmitoyl group were not significantly less efficient than the initially tested α -aminohexadecanoylamide residue.

Table 5 Influence of N-term and C-term modification on V3S and V3L peptide immunogenicities

Denomination	Construct	Positive over total	P815		P815 + V3		P815 + VacENV		P815 + Vac GAG	
			100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1	100:1	20:1
Hda-V3S-Hda	H-Hda-312-327-Hda-NH ₂	1/3	<2	2	37	26	18	11	<2	<2
			<2	2	10	7	9	5	10	<2
			3	7	12	9	5	2	8	3
PamLys(Pam)-V3S-Hda	PamLys(Pam)-312-327-Hda-NH ₂	0/3	<2	<2	<2	<2	2	<2	<2	<2
			6	3	2	5	6	2	9	6
			10	5	12	7	9	5	12	3
Hda-V3L-Hda	H-Hda-302-335-Hda-NH ₂	3/3	<2	<2	47	39	23	14	4	3
			8	3	45	30	38	26	15	8
			3	<2	42	16	24	8	8	<2
PamLys(Pam)-V3L-Hda	PamLys(Pam)-302-335-Hda-NH ₂	1/3	5	2	4	2	nt	nt	nt	nt
			3	<2	10	4	nt	nt	nt	nt
			4	<2	30	11	27	10	12	<2

*See Table 1

Taking into account practical considerations such as enantiomeric purity and accessibility to conventional methods for synthesis and purification, these findings indicate that C-terminal modification of long (over 25 residues) peptide sequences by a single N^ε-palmitoyl-Lysylamide residue may be suitable for developing low-cost synthetic vaccines in models in which the CTL component is of importance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS). We gratefully acknowledge Professor G. Jung (Tübingen, Germany) for a generous gift of Pam₃Cys-Ser-Ser.

REFERENCES

- Kovacovics-Bankowski, M. and Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995, **267**, 243-246
- Deres, K., Schild, H., Wiesmüller, K.H., Jung, G. and Rammensee, H.G. *In vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine. *Nature* 1989, **342**, 561-564
- Deprez, B., Gras-Masse, H., Martinon, F., Gomard, E., Levy, J.P. and Tartar, A. Pimelaute and Trimexaute as built-in adjuvants associated with an HIV-1-derived peptide: synthesis and *in vivo* induction of antibody and virus-specific cytotoxic T-lymphocytes-mediated response. *J. Med. Chem.* 1995, **38**, 459-465
- Martinon, F., Gras-Masse, H., Boutillon, C. et al. Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. *J. Immunol.* 1992, **149**, 3416-3422
- Takahashi, H., Cohen, J., Hosmalin, A. et al. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1988, **85**, 3105-3109
- Takahashi, H., Germain, R.N., Moss, B. and Berzofski, J.A. An immunodominant class-I restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type I induces CD4 class-II restricted help for itself. *J. Exp. Med.* 1990, **171**, 571
- Ahmad, M.S. and Logani, S.C. Lithium aluminium hydride-aluminium chloride reduction of steroidal cyclic acetals. *Aust. J. Chem.* 1971, **24**, 143-151
- Merrifield, R.B. Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, **85**, 2149-2154; Merrifield, R.B. Solid phase synthesis. *Science* 1986, **232**, 341-347
- Hudson, D. Methodological implication of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *J. Org. Chem.* 1988, **53**, 617-624. Le-Nguyen, D., Heitz, A. and Castro, B. Renin substrate. Part 2. Rapid solid phase peptide synthesis of the ratine sequence tetradecapeptide using BOP reagent. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1987, **1**, 1915-1916
- Fields, G. and Noble, R. Solid phase synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, **35**, 161-214
- Pouliot, J.F. and Béliveau, R. Modifications post-traductionnelles des protéines par des lipides. *Médecine/sciences* 1994, **10**, 65-73
- Sauzet, J.P., Deprez, B., Martinon, F., Guillet, J.G., Gras-Masse, H. and Gomard, E. Long-lasting anti-viral cytotoxic T lymphocytes induced *in vivo* with chimeric-multi-restricted lipopeptides. *Vaccine* 1995, **12**, 1339-1345
- Bourgault, I., Chirat, F., Tartar, A., Levy, J.P., Guillet, J.G. and Venet, A. Simian immunodeficiency virus as a model for vaccination against HIV. Induction in rhesus macaques of GAG- or NEF-specific cytotoxic lymphocytes by lipopeptides. *J. Immunol.* 1994, **152**, 2530-2537