



ADN Minicercle – un nouvel outil pour le développement d'un vaccin contre l'hépatite B

Martin Schleef et Marco Schmeer, PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Meisenstr. 96, 33607 Bielefeld - martin.schleef@plasmidfactory.com

Les stratégies de thérapie génique et cellulaire non virale, ainsi que de vaccin à ADN utilisent actuellement essentiellement de l'ADN plasmidique ou ses dérivés linéaires. Les plasmides conventionnels contiennent de grandes proportions avec des parties de séquence, qui permettent par exemple leur répllication bactérienne (*ori*) ou leur sélection et constituent jusqu'à 50% de la séquence totale. Dans cette zone, ils codent, par exemple, des résistances aux antibiotiques (ABR) pour la sélection et contiennent de nombreux motifs CpG qui, du fait de leur effet immunostimulant, sont associés à une efficacité réduite de l'expression des gènes. Du fait qu'ils ne sont donc pas seulement superflus pour la fonction visée dans la cellule cible, mais qu'ils représentent également un risque dans le cas de l'ABR d'un point de vue pharmaceutique, la PlasmidFactory a développé sa plateforme technologique brevetée pour la fabrication de ce qu'on appelle des *Minicercles*. Grâce à la recombinaison intramoléculeuse de deux séquences, la partie de la séquence indésirable d'un plasmide (y compris *ori* et ABR) est entièrement éliminée de manière ciblée et il en résulte deux anneaux d'ADN^{1,2}. L'un est le plasmide résiduel (également appelé miniplasmide) avec les séquences indésirables et l'autre est le *Minicercle*, qui est constitué presque exclusivement de la séquence circulaire de la cassette d'expression contenue dessus (Fig. 1). La séparation des deux anneaux a lieu à l'aide d'un procédé de chromatographie spécial, dans lequel seul le *Minicercle* est purifié.

Dans des essais de transfection avec de l'ADN *Minicercle* à gène rapporteur par rapport à des plasmides standard correspondants, les *Minicercles* présentent des taux de transfection^{3,4} nettement plus élevés. Les *Minicercles* sont parfois plus petits que le plus petit plasmide présenté jusqu'à présent, ce qui améliore nettement leurs propriétés de transfection. En outre, ils sont super-spiralés (forme ccc) et donc fortement condensés. De plus, les *Minicercles* fabriqués par PlasmidFactory ont la propriété de présenter exclusivement une forme : il s'agit de monomères ccc purs, ce qui est une condition indispensable pour une utilisation dans le domaine pharmaceutique.

L'intérêt grandissant pour ce nouveau système de vecteur se fait sentir et la PlasmidFactory propose aussi bien de l'ADN *Minicercle* prêt à l'envoi avec divers gènes rapporteurs que la fabrication d'ADN *Minicercle* individuel avec des séquences spécifiques au client. Actuellement, en plus de nombreux *Minicercles* pour la transfection, la thérapie génique et la génétique végétale, un vaccin à ADN contre l'hépatite B est produit à base de *Minicercle*. Une vue d'ensemble concernant

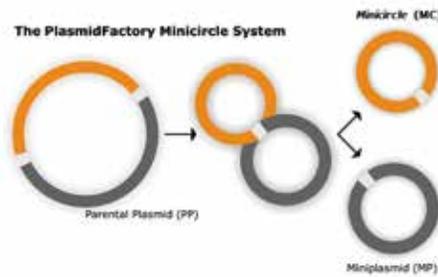


Fig. 1 : Schéma de fabrication d'ADN *Minicercle* pour des vaccins contre le VHB : Le plasmide parental est divisé après induction de la recombinaison intramoléculeuse en un miniplasmide et un *Minicercle*. Celui-ci est ensuite purifié à l'aide d'un procédé chromatographique

les *Minicercles* et les miniplasmides, avec des exemples d'application, a été publiée sous forme de livre. Il en ressort que la sécurité des produits, en ce qui concerne le vaccin à ADN, peut être améliorée par l'utilisation de *Minicercle* par rapport à l'utilisation de plasmides habituels. Le premier vaccin à ADN, basé sur la technologie *Minicercle*, a été obtenu en transférant l'antigène superficiel S2S de l'hépatite B, en tant que « Gene of Interest », du plasmide pCMV5S2S utilisé jusqu'à présent sur un plasmide parental, qui sert de base pour la fabrication du *Minicercle* correspondant. Les premiers résultats des essais, qui ont été réalisés en étroite collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris, montrent un très haut niveau d'expression et donc une immunisation réussie contre le VHB chez des souris.

Bibliographie :

- Schleef, M. (Ed.) *Minicircle and Miniplasmid DNA vectors – the future of non-viral and viral gene transfer*; 2013, Wiley Blackwell, Weinheim.
- Schleef, M., Blaesen, M., Schmeer, M., Baier, R., Marie, C., Dickson, G., and Scherman, D. (2010) Production of Non Viral DNA Vectors. *Curr. Gene Therapy* 10, 487-507.
- Kolbelt, D., Schleef, M., Schmeer, M., Aumann, J., Schlag, P.M., Walther, W. (2013), Performance of High Quality Minicircle DNA for In Vitro and In Vivo Gene Transfer. *Mol. Biotechnol.*, 53 (1), 80-89.
- Chabot, J., Orio, M., Schmeer, M., Schleef, M., Golzio, J., Teissie (2013), Minicircle DNA Electrotransfer for efficient Tissue targeted Gene Delivery. *Gene Therapy* 20 (1), 62-68.

ReadyTector® : Détection rapide de plusieurs analytes pour Western blots, y compris sans fluorescence

CANDOR Bioscience GmbH - Tél. : +49 (0) 7522 795270

Fax : +49 (0) 7522 7952729 - info@readytector.com - www.readytector.com

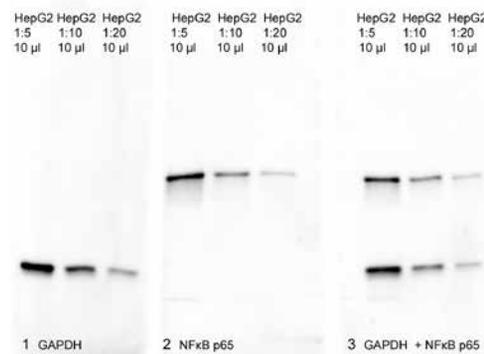
ReadyTector® est la solution de détection « tout-en-un » pour Western blots. ReadyTector® contient tous les composants nécessaires à une immunodétection rapide en une seule étape. Avec ReadyTector®, le blocage et la liaison des anticorps primaire et secondaire s'effectuent en même temps. Ensuite, il ne reste plus qu'à laver avec le tampon de lavage spécial ReadyTector® et le signal peut être détecté avec un substrat chimiluminescent. Chaque utilisateur n'a plus qu'à ajouter son anticorps primaire spécifique.

Différents anticorps primaires peuvent même être ajoutés en même temps.

Il est donc possible de détecter simultanément plusieurs protéines sur la membrane. Cela permet d'économiser beaucoup de temps, car il n'est pas nécessaire de stripper la membrane après la détection avec le premier anticorps pour effectuer ensuite une seconde détection avec un autre anticorps.

Les illustrations présentent les détections avec deux anticorps primaires différents et, à titre de comparaison, la détection de plusieurs analytes en une seule étape avec les deux anticorps primaires.

Avec ReadyTector®, la détection de plusieurs analytes sur une membrane Western blot en une seule étape est simple et rapide. Un stripping et une seconde détection sont superflus. ReadyTector® est disponible comme Anti-Mouse-HRP et Anti-Rabbit-HRP.

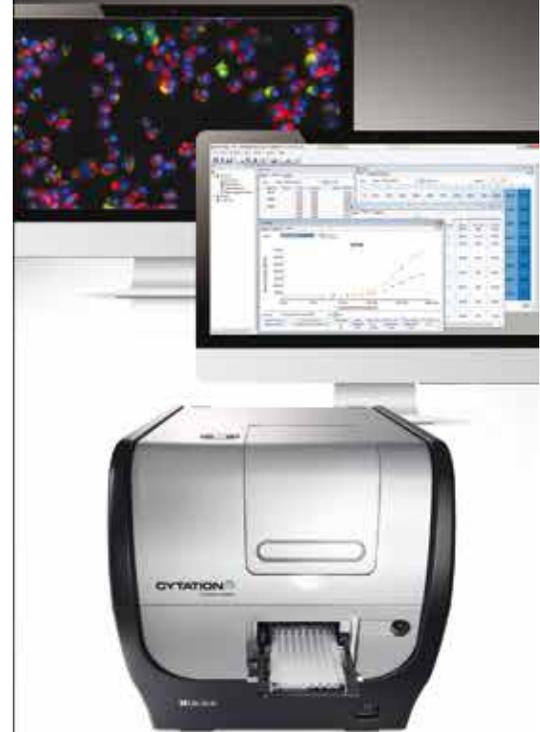


Les pistes 1-3 contiennent chacune 10 µl de lysat HepG2. La détection présentée sur la figure 1 a été effectuée avec ReadyTector® Anti-Rabbit-HRP et Anti-GAPDH (110 ng/ml).

La détection présentée sur la figure 2 a été effectuée avec ReadyTector® Anti-Rabbit-HRP et Anti-NfκB p65 (200 ng/ml).

La détection de plusieurs analytes présentée sur la figure 3 a été effectuée avec ReadyTector® Anti-Rabbit-HRP, Anti-GAPDH (110 ng/ml) et Anti-NfκB p65 (200 ng/ml) en une seule étape.

Microscopie Brillante & Données Remarquables



FAITES CE QUE VOUS N'AVEZ JAMAIS CRU POSSIBLE

Cytation™ 5 est un imageur cellulaire automatique et lecteur de microplaque compact, qui permet de capturer et analyser des images rapidement et facilement. Un système simple, précis et flexible pour votre laboratoire.

Think Possible



BioTek France

BioTek Instruments SAS
50 avenue d'Alsace, 68025 Colmar Cedex
Tel: 03 89 20 63 29, Fax: 03 89 20 43 79
info@biotek.fr, www.biotek.fr

BioTek Switzerland

BioTek Instruments GmbH
Zentrum Fanghölfl 8, 6014 Luzern
Tel: 041 250 40 60, Fax: 041 250 50 64
info@biotek.ch, www.biotek.ch