



La nanomédecine, ses applications possibles en Santé Animale, le point de vue d'un industriel.

Présentation du 7 mars 2013
Académie Vétérinaire de France
Jean Delaveau

La nanomédecine en médecine humaine et vétérinaire

- Introduction
- Echelle relative des nano objets
- Aspects réglementaires et sécurité
- Exemples en Santé Humaine et Animale
- Conclusions et perspectives en Santé Animale
- Références
- Annexes: définition des différents types de nano objets



Introduction à la nanomédecine

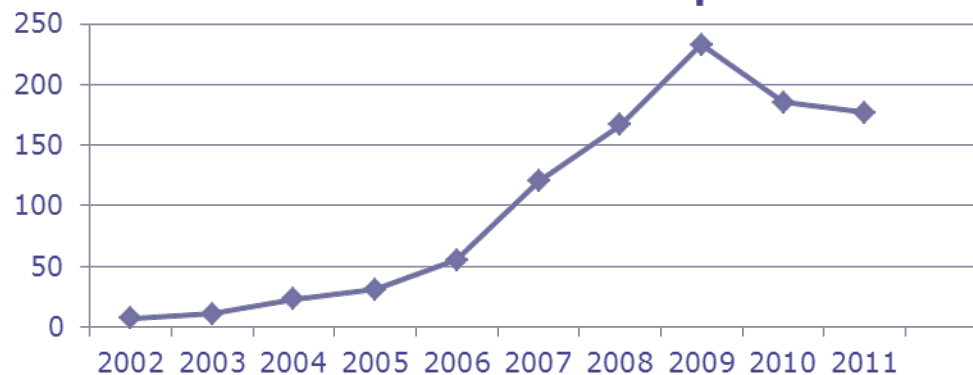
Une activité intense dans la recherche pharmaceutique.

Publications sur les dix dernières années, mots clés:

« Nanomedicine, Nanoparticles, Nanoencapsulation, Nanotechnology, Nanomedicine safety, and Veterinary medicine, Vaccines » 2002-2012.

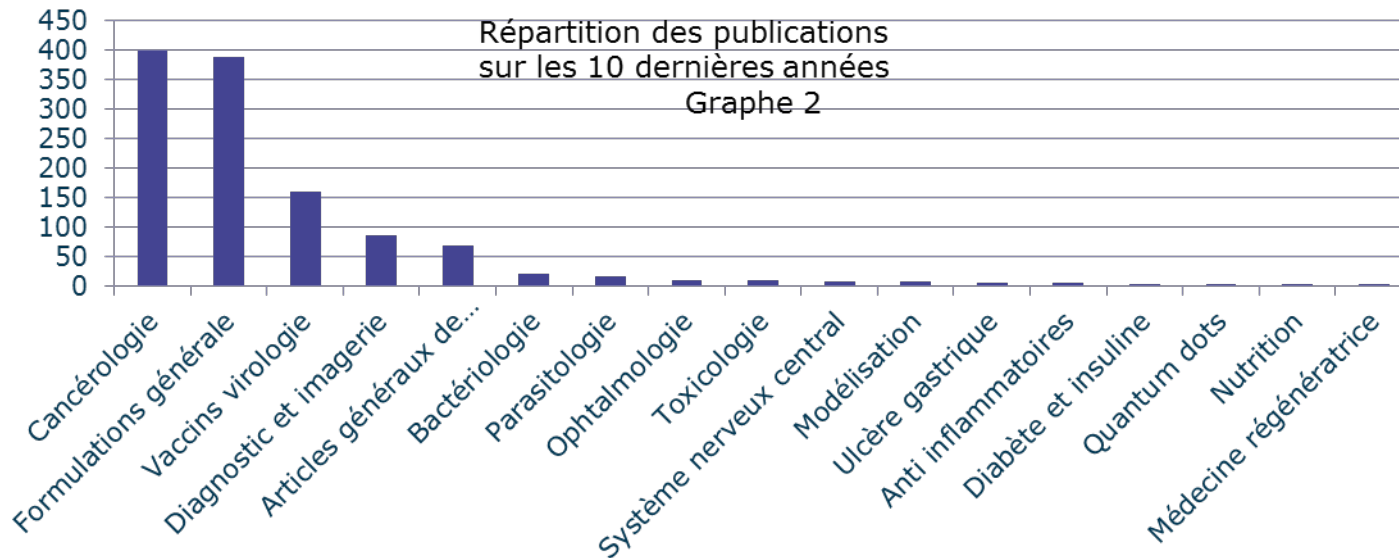
- 1206 documents
- 150 à 200 publications par an avec moins de 10 publications par an en santé animale. Graphe 1.

Nombre de publications en nanomédecine Graphe 1

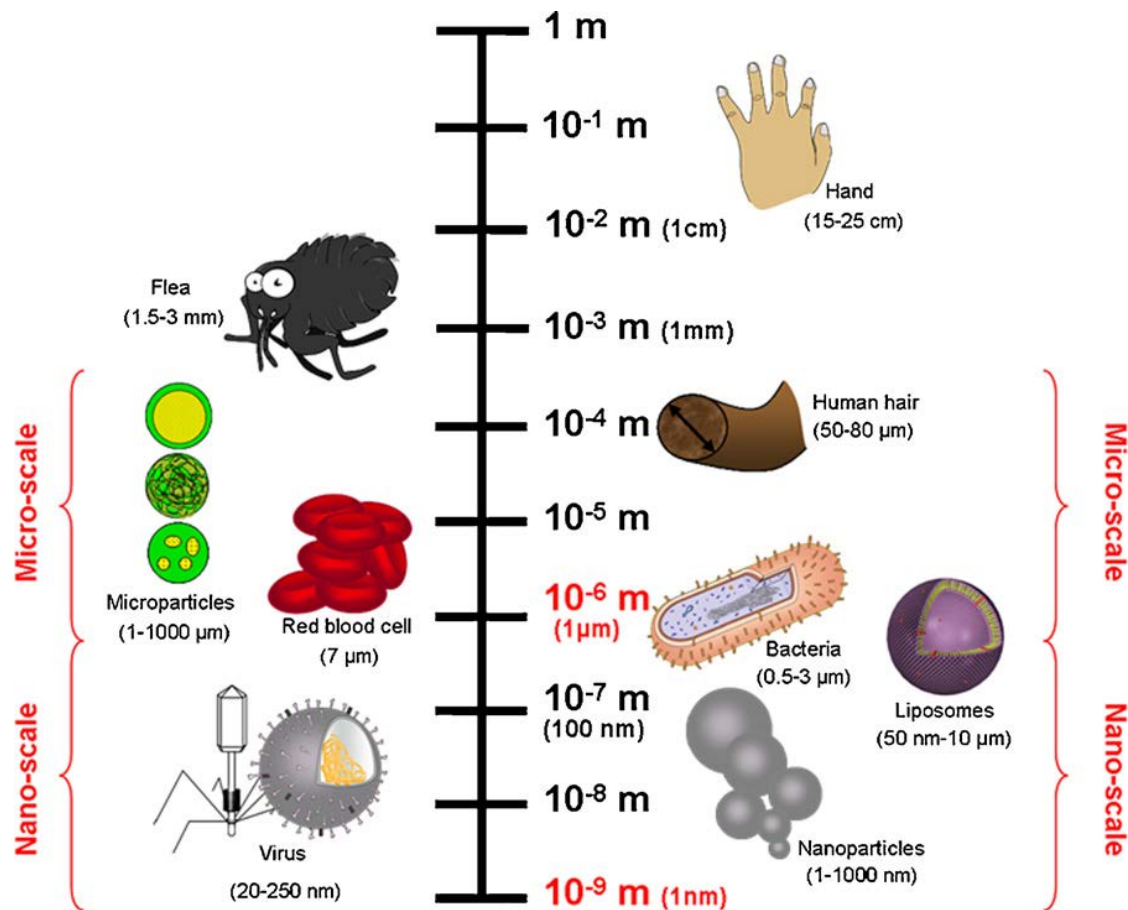


Répartition des publications

- Répartition des publications sur les 10 dernières années.
- L'oncologie avec des polymères.
 - **Le chitosan, polymère naturel proche de la chitine**
 - **PLGA un polyester d'acide lactique et glycolique.**
- Formulation de vaccins en virologie et des applications en imagerie médicale.
- Graphe 2.



Nanomédecine: échelles relatives des objets



Graphe 3. Echelle donnant les dimensions respectives des objets en nanomédecine.
D'après Irache J.M. 2011



Nanomédecine: échelles relatives des objets

- L'échelle relative des objets indique les relations. Les nano objets existent déjà dans la nature tels que les virus.
- Les nano objets acquièrent une surface spécifique beaucoup plus élevée.
 - **Due à l'augmentation plus rapide de la surface vis-à-vis du volume**
 - **A la notion de géométrie fractale.**
- Les nouvelles propriétés envisageables possibles:
 - Amélioration de la biodisponibilité.
 - Réduction de la toxicité. Moins de matière active, moins d'effets secondaires.
 - Action et élimination plus rapide.
 - Conception de nano objets ciblant des cellules malades via des ligands spécifiques.
 - Nombreuses applications en Santé Animale à partir de la Santé Humaine



Aspects réglementaires et sécurité

Actualité pour les autorités de tutelle: obligation de déclaration auprès du ministère de tutelle pour:

- Fabrication et transformation:
 - **Réglementation: taille entre 1 et 100 nm.**
 - **Surface spécifique supérieure à 60 m²/cm³.**
 - **Tout produit dont 50% entre dans cette fourchette.**

Directive de la commission de Bruxelles publiée au Journal Officiel de l'Union Européenne. L275/38 du 20.10.2011.

- Le dossier d'enregistrement traite tous les aspects de sécurité.
- Dans les vaccins: la notion de nano objets est déjà familière pour les autorités. Utilisation courante en formulation des nano émulsions, des nano particules comme les virus



Aspects réglementaires et sécurité

- Organismes européens experts sur l'évaluation des risques en nanotechnologies (SCENIHR¹, SCCS², EFSA³ et l'EMA⁴).
- Des études du compromis risque-bénéfice ont été communiquées. Des autorisations ont été accordées pour 20 formulations médicinales et trois produits en contact direct avec l'alimentaire.
- Forte volonté d'harmonisation et de standardisation au sein de l'Union Européenne. Ces objectifs prioritaires par le Centre de Recherche de la Commission européenne, comme les procédures REACH.
- Une étude sécurité de la Commission de Bruxelles en 2011 en cours sur le devenir des nanomatériaux: environnement, recyclage etc.
- Les recommandations à parvenir en 2014.
 - **¹Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, ²Scientific Committee on Consumer Safety, ³ European Food and Safety Agency, ⁴ European Medicinal Agency.**



Aspects réglementaires et sécurité

- Constitution par l'ECHA (European Chemical Agency) d'un groupe d'experts (GAARN: Group Assessing Already Registered Nanomaterials) pour évaluer la sécurité des produits.
- Un groupe de travail dépendant de l'ANSES sur le thème « nanomatériaux et santé ».
 - **L'objectif de ces groupes: constituer un référentiel de bonnes pratiques pour identifier, déclarer et utiliser les nano matériaux.**
- Une présentation par l'ACSHW (Advisory Committee on Safety and Health at Work) présentera des textes législatifs en 2014 sur la réglementation de l'activité.
- Document guide de L'EFSA (European Food Safety Agency) pour la déclaration d'usage des nano matériaux dans l'alimentation humaine et animale.
- Un site internet pour répondre aux questions et échanger, unetude d'impact de La Commission pour faciliter les échanges.
- La réglementation et la sécurité des nano objets bien pris en compte par l'EMA et les autres agences européennes.



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

- Formulations pharmaceutiques
- Vaccins
- Diagnostics



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Formulations pharmaceutiques: *produits anticancéreux, une libération plus longue, des meilleures cinétiques plus efficaces.*

- Premières applications dans les anticancéreux. Formulation par liposomes ou nano encapsulation.
 - **meilleure observance**
 - **traitement plus efficace et mieux ciblé, meilleures cinétiques et réduction des effets secondaires**
 - **Un indice thérapeutique amélioré.**
- **Des formulations anticancéreuses injectables possibles en santé animale, liposomes tel la doxorubicine (traitement du lymphome), paclitaxel (traitement du cancer des ovaires). Nanocapsules lipidiques (Benoit J.P. 2011 et Koudelka S. 2012).**
- **Formulations orales de Docetaxel à base de polymères biodégradables (PLGA) associé à la vitamine E et montmorillonite: 3 semaines comparées à 22 h pour une i.v. de la matière active seule. (Si-Shen F. 2009).**



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Formulations pharmaceutiques: *anti infectieux, anti inflammatoire, les nano formulations permettent des durées d'activité plus longues et plus spécifiques.*

- Enrofloxacin à base de nanoparticules de lipides solides pour un injectable i.m. temps de libération 2 à 6 fois plus longs soit de 10 à 180 heures. (Shuyu X. 2011).
- Utilisation de silice nanoporeuse pour la libération prolongée d'antibiotiques, traitement de l'otite. (Lensing R. 2012).
- Bétaméthasone lié au polymère PEG-PLA en nanoparticule lyophilisé. Réduction de la réponse inflammatoire sur un modèle d'arthrite chez le rat. Piégeage préférentiellement dans la région inflammatoire, libération dans les 14 jours (Tsutomu I. 2010).
- Encapsulation de Gentamicin en liposome sensible au pH. Augmentation de la puissance antibactérienne par 10^4 . Carol Cordeiro 2000.



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Formulations pharmaceutiques antiparasitaires et siRNA: *une augmentation de l'efficacité.*

- Praziquantel avec des lipides solides de 110 nm. Augmentation d'un facteur 4 la surface sous la courbe vis-à-vis d'un comprimé. (Yang L. 2009)
- Utilisation de chitosan conjugué à des matières actives. Forme d'administration très efficace pour les voies respiratoires. L'anti-inflammatoire a présenté une demi-vie de 132 heures et son pic d'élimination a commencé 6 heures après l'instillation. (Choi M. 2010).
- Libération de siRNA au moyen de nanosomes (liposomes de très petites tailles inférieures à 100 nm) solution efficace pour les cellules hépatocytes atteintes du virus C: la cible atteinte à près de 100% et nettoyée à près de 85% tout en maintenant une viabilité des cellules à près de 90%. (Kundu A. 2012).



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Vaccins: La formulation de nano sphères de PLA et d'antigène tout comme la construction de nano objets simulant des virus permet une meilleure réponse immunitaire.

- Nanosphères de PLA associant une protéine de Streptococcus equi comparées avec différents adjuvants. Les réponses nanosphères étaient largement supérieures aux réponses des antigènes seuls ou adjoints de CpG. (Florindo H. 2009).
- Nanoparticules de protéines recombinées de nucléocapside avec un RNA bactérien forme une structure sub-nucléaire. Réponse immunitaire élevée dans un modèle de souris infecté par le virus RSV. (Roux X. 2008).
- Résultats encourageants dans la vaccination Leishmaniose utilisant des nanoparticules de PLGA chargées du plasmide recombiné codant la protéine KMP-11 et par des nanoparticules chargés de la protéine en rappel. Réponses immunitaires supérieures à l'utilisation du plasmide recombiné seul. La charge en protozoaire était nettement réduite au site d'injection. (Santos D. 2012).



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Vaccins: l'encapsulation en nano particules d'antigènes avec des polymères ou des lipides permet une meilleure protection et de plus grandes réponses immunitaires.

- Nano capsules d'acide polyméthacrylique avec de l'ovalbumine. Présentation avec succès des épitopes de la protéine. Activation des récepteurs spécifiques CD4 et CD8 des cellules T sur un modèle souris. Protection des épitopes sensibles tels ceux de la protéine ovalbumine. (Sexton A. 2009).
- L'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuse (HMSNs) adsorption de la protéine PCV2 GST-ORF2-E purifiée, responsable du circovirus type 2 chez le porc. Identification des anticorps spécifiques IFN- γ par immunoabsorption. Les HMSNs sont bons transporteurs. Fort potentiel d'utilisation pour la libération des matières actives.
- Nouvelle nanoparticule développée par le MIT, bien adaptée pour la libération de protéines antigéniques. Structure multicouches lipidiques interconnectées avec des particules antigéniques et des matières actives stimulantes. Une des plus fortes réponses immunitaires par les cellules (MoonT.JJ 2011).



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Diagnostiques et imagerie médicale

Domaines en forte croissance pour la nano médecine.

Possibilité de construire des objets de très petites dimensions avec une affinité bien spécifique à une cible. Dosage des composés à des valeurs très faibles.

Dans le cas de l'imagerie, liaison à des récepteurs pour répondre à une stimulation magnétique ou lumineuse telle la fluorescence ou encore à un rayonnement électromagnétique. Représentation en 3D d'une tumeur avec une grande précision.

Exemple des SPIONS (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticules), noyaux ferromagnétiques greffés avec des polymères et des matières actives.

Les critères:

Circulation libre dans le corps pour atteindre sa cible.

Pas d'incompatibilité avec la cible.

Expression au moyen d'un agent de contraste. (Veisheh O. 2010).



Exemples d'applications des nano médecines en santé humaine et animale

Diagnostics et imagerie médicale

- Exemples exclusivement dans le domaine de la cancérologie.
- Des molécules comme l'acide folique, le méthotrexate visant le récepteur folate en vue de l'imagerie du cancer du sein, traitement des tumeurs au cerveau, ou des peptides visant des phospholipides, des $\alpha\beta_3$ integrin, MMP-3 pour les mêmes cibles.
- Des aptamères A10 RNA visant une représentation du cancer de la prostate.
- De masse moléculaire plus importants encore, des protéines annexin V , LHRH ou Transferrin visant des récepteurs transferrin pour l'imagerie de l'apoptose ou le cancer du sein.
- Des constructions impliquant des anticorps monoclonaux type A7 visant le carcinome colorectal, Herceptin (Trastuzumab) visant Her2/neu pour le cancer du sein ou le Rituxan (Rituximab) le récepteur CD20 dans le cas de B-cell pour des lymphomes non Hodgkin. (Veisheh O. 2010).



Exemples d'applications des nano médecines sur le marché

- 200 le nombre de nano particules en développement comprenant des matières actives, dont 30 en cours d'essais cliniques pour l'homme et un nombre comparable en essais cliniques. (Wagner V. 2006).
- Deux exemples:
 - **la Deximune[®] de Dexel Pharma Ltd. Pro-nano liposphères de 25 nm. Formation spontanée dans l'estomac après l'administration orale d'une gélule. La Deximune[®] est indiquée dans les rejets de greffes allogènes car elle comprend un immunosuppresseur la cyclosporine A. La biodisponibilité de ce produit est comparable à la microémulsion Sandimmune Neoral[®] de Novartis mais supérieure de 50% à la formulation d'origine, une solution alcool et huile.**
 - **Le Skedaddle[™] Autre formulation à base de liposphères comprenant un répulsif le DEET (diethyl-meta-toluamide). Formulation enregistrée à l'EPA (environmental protection agency) réduit l'exposition de l'épiderme à ce répulsif irritant, propriétés de solvant. Indication pour les enfants dès l'âge de 2 ans.**



Conclusions et perspectives en Santé Animale

■ Facteurs favorables ?

Multiples intérêts en Santé Humaine et par voie de conséquence en Santé Animale pour les raisons suivantes:

- **Amélioration de la biodisponibilité des matières actives: 95% avec faible biodisponibilité. (Brayden D.J. 2003)**
- **Meilleure spécificité, efficacité et meilleur indice thérapeutique.**
- **Amélioration de la pharmacocinétique, libération sur plusieurs jours voire semaines.**

■ Quels sont les freins à ces applications ?

- **Coûts de développement et d'industrialisation.**
- **En vaccinologie, les nanotechnologies déjà utilisées dans des nanoémulsions. Usage répandu et plus abordable, plus faibles coûts.**
- **Complexité des constructions pour les formes conjuguées.**



Conclusions et perspectives en Santé Animale

- Quelles sont les futures applications possibles ?

En pharmacie:

- **La cancérologie pour les animaux de compagnie**
- **Des formulations injectables mieux adaptées: durée, doses, effets secondaires limités.**
- **La formulation d'antiparasitaires en forme injectable, topique ou orale.**
- **La formulation d'antibiotiques ou d'anti inflammatoires pour des durées de relargage contrôlées: des nano encapsulations pour des libérations de 8 jours, 15 jours ou plus.**
- **Le diagnostic et l'imagerie médicale pour des animaux de compagnie. Détection des tumeurs, des infections ou inflammations locales.**

En vaccinologie:

- **La formulation d'objets complexes encapsulés, augmentant la réponse immunitaire, agissant en une seule injection avec des combinaisons de plusieurs antigènes et de nucléotides.**



- Références des publications
- Définition de la nanomédecine
- Classification des nano objets
 - **Formes inorganiques**
 - **Formes organiques**
 - Liposomes
 - Nanoparticules de lipides solides
 - Nano émulsion
 - Polymères en liaison covalente avec des actifs
 - Micelles de polymères
 - Dendrimères
 - Nanoparticules composées de polymères



Références I

- *Brayden, D.J., 2003. Controlled release technologies for drug delivery. Drug Discovery Today 8, 976-978.*
- *Choi M., Minjung C., Beom S., Han, J., H., Jayoung J., Sangjin P., Myung-Haing C., Kwangmeyung K., Wan-Seob C. 2010. Chitosan nanoparticles show rapid extrapulmonary tissue distribution and excretion with mild pulmonary inflammation to mice. Toxicology Letters 199, 144-152.*
- *Cordeiro C., Wiseman, D.J., Lutwyche, P. Uh, M., Evans, J.C., Finlay, B.B., Webb, M.S., 2000, Antibacterial Efficacy of Gentamicin Encapsulated in pH-Sensitive Liposomes against In Vivo Salmonella enterica Serovar Typhimurium Intracellular Infection Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Mar. 2000, p.553-539.*
- *Cubillos, C.de la Torre, B.G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Barcena, J., Andrew D., Sobrino, F., Blanco, E., 2008. Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide. Journal of Virology 82, 7223-7230.*
- *Florindo H. F., Pandit, S., Goncalves, L.M., Videira, M., Alpar, O., Alemeida, A.J., 2009. Antibody and cytokine-associated immune responses to S.equi antigens entrapped in PLA nanospheres. Biomaterials 30, 5161-5169.*
- *Gaucher, G, Satturwar, P., Jones, MC.C, Furtos, A., Leroux, J.C., 2010. Polymeric micelles for oral drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 76,147-158.*
- *Huynh N.T.,. et al. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. Int. Journal of Pharmaceutics 379 (2009)201-209*
- *Irache J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., Espuelas, S., 2011.Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. Veterinary Parasitology 180 (2011) 47-71.*
- *Ishihara T., Miyuki, T., Megumu, H., Yutaka, M.,Tohru, M., 2010. Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents. International Journal of Pharmaceutics 385 (2010) 170-175.*
- *Koudelka S., Turanek, J.,2012. Liposomal paclitaxel formulations. Journal of Control Release 163 (2012) 322-334.*



Références II

- Kundu A.,K.,Chandra, P.,K., Hazari, S.,Pramar,Y.,V., Dash,S., Mandal, T.,K., 2012. *Development and optimization of nanosomal formulations for siRNA delivery to the liver. European Journal of Pharmaceutics* 80 (2012) 257-267.
- Lensing, R. Bleich, A., Smoczek, A., Glage,S., Ehlert,N., Luessenhop.,T.,Behrens,P., Müller, P., P., Kietzmann, M., Stieve, M., 2012. *Efficacy of nanoporous silica coatings on middle ear prostheses as a delivery system for antibiotics: An animal study in rabbits.*
- Masek J., Bartheldyova, E., Turanek-Knotigova, P., Skrabalova, M., Korvasova, Z., Plockova, J., Koudelka, S., Skodova P., Kulich, P., Krupka, M. et al. 2011. *Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. Journal of Controlled Release* 151 (2011) 193-201.
- Mintzer, M.A., Grinstaff,M.W., 2011.*Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. Chem.Soc.Rev.*40,173-190.
- Paleos, C.M.,Tziveleka, L.A.,Sideratou, Z., Tsiourvas, D., 2009 *Gene delivery using functional dendritic polymers. Expert Opinion on Drug Delivery* 6, 27-38.
- Roux X., Dubuquoy,C., Durand,G., Thi-Lan T.T., Castagné, N.,Bernard, J., Petit-Camurdan, A., Eléouët, J-F., Riffault, S., 2008. *Sub-Nucleocapsid Nanoparticles: A Nasal Vaccine against Respiratory Syncytial Virus. PLoS ONE March 2008, Volume 3 Issue3 e1766.*
- Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Fukutani K, Clarencio J, Soto M, Espuelas S, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, de Oliveira CI.. 2012. *Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-II. International Journal of Nanomedicine* 2012:7: 2115-2127.
- Si-Shen F., Lin, M., Panneerselvan A., Chee, W., G., Wenyou, Z., 2009. *Poly(lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of Docetaxel. Biomaterials* 30 (2009) 3297-3306.



Références III

- Shuyu X., Luyan Z., Shao D., Xiaofang W., Yan W., Xihe L., WenZhong Z., 2011. Preparation, characteriation and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: Influences of fatty acids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83:382-387.
- Sun, X.,Zhang, N. 2010. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *Mini Rev.Med.Chem.*10,108-125.
- Szebeni J, Alving CR, Rosivall L, Bünger R, Baranyi L, Bedöcs P, Tóth M, Barenholz Y.,2007. Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. *Journal of Liposome Research* 17, 107-117. (2007).
- Underwood C., van Eps, A.W.,2012. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. *The Veterinary Journal* 193 (2012) 12-23.
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.K., Sweck, A., 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* 24, 1211-1217.
- Yang L., Geng Y, Li H, Zhang Y, You J, Chang Y. et al. Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles. *Pharmazie* 64:86-89 (2009).
- www.nanoforum.org
- <http://gnhecd.jrc.ec.europa.eu/>
- <http://goodnanoguide.org>
- http://www.nanowerk.com/phpscripts/n_dbsearch.php
- www.fda.gov/nanotechnology/
- <http://www.observatory-nano.eu/project/>

