

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ

Р.Н. Аляутдин, Б.К. Романов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Резюме: Представлены методические рекомендации по доклинической оценке безопасности лекарственных средств, содержащих наночастицы. В рекомендациях представлены условия проведения исследований острой и хронической токсичности нанопрепаратов, методы их количественной и качественной оценки.

Ключевые слова: нанотехнологии, токсичность, лекарственное средство.

Библиографическое описание: Аляутдин РН, Романов БК. Рекомендации по оценке безопасности лекарственных средств, содержащих наночастицы. Безопасность и риск фармакотерапии. 2015; (4): 10-22.

RECOMMENDATIONS ON SAFETY ASSESSMENTS OF MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING NANOPARTICLES

R.N. Alyautdin, B.K. Romanov

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»,
Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Russia, Moscow

Abstract. Recommendations for preclinical safety assessment of medicinal products containing nanoparticles are presented. The recommendations provide conditions for research acute and chronic toxicity of nanotherapeutics, methods for their quantitative and qualitative assessments.

Key words: nanotechnology, toxicity, drug.

Bibliographic description: Alyautdin RN, Romanov BK Recommendations on safety assessments of medicinal products containing nanoparticles. Safety and Risk of Pharmacotherapy. 2015;(4): 10-22.

1. Введение

1.1. Область применения

Рекомендации предназначены для обеспечения надлежащей подготовки, анализа и обобщения доклинических исследований препаратов, содержащих наночастицы.

Рекомендации предназначены для использования специалистами и экспертами в сфере безопасности лекарственных средств для медицинского применения, а также заявителями при проведении клинических исследований и при пострегистрационном фармаконадзоре лекарственных препаратов для медицинского применения, содержащих наночастицы.

1.2. Нормативные ссылки

Экспериментальная оценка общетоксического действия фармакологических веществ и средств медицинского назначе-

ния, содержащих наночастицы, базируется на общих принципах доклинической лабораторной практики в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. Основными документами, регламентирующими объем, схему и процедуру проведения экспериментов по исследованию безопасности фармакологических веществ, полученных на основе нанотехнологии, являются:

- Федеральный Закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

- Федеральный Закон № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

- Федеральный закон Российской Федерации N 429-ФЗ "О внесении изменений в Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 22 декабря 2014

- Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».
- Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 года № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».
- Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».
- Методические рекомендации (МР) 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*: Методические рекомендации. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 69 с.
- МР 1.2.2522-09. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. Методические рекомендации. — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 35 с.
- МР 1.2.2639-10. Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях nanoиндустрии. — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 79 с.
- По мере накопления новых сведений, раскрывающих особенности тестирования токсичности наночастиц, несомненна необходимость гармонизации с международными стандартами International Organization for Standardization — ISO, группой международной Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) и научным комитетом — The Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR).
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 755н "Об утверждении порядка определения уровня профессиональной подготовки экспертов Федерального государственного бюджетного учреждения по проведению экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и аттестации их на право проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения".
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 748н "Об утверждении порядка выдачи разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения".
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 749н "Об утверждении формы документа, содержащего результаты мониторинга безопасности лекарственного препарата для медицинского применения в целях подтверждения его государственной регистрации".
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 750н "Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов".
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 757н "Об утверждении порядка осуществления мониторинга безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения, регистрации побочных действий, серьезных нежелательных реакций, непредвиденных нежелательных реакций при применении лекарственных препаратов для медицинского применения".
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 759н "Об утверждении порядка представления необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации".
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н "Об утверждении правил лабораторной практики".
- Государственный реестр лекарственных средств [<http://grls.rosminzdrav.ru>].
- Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н. 28.
- Приказ Минздравсоцразвития России от 23 ноября 2011 г. № 1413н "Об утверждении Методических рекомендаций по содержанию и оформлению необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации".

1.3. Понятия и термины

Дендримеры – сферические структуры, состоящие из разветвляющихся полимеров. Все ветви полимеров берут начало в одной точке, ядре. Образуют внутренние полости, которые могут использоваться для включения лекарственных веществ. Конце-

вые группировки ветвей способны связываться с дополнительными структурами, например векторами.

Липосомы – везикулы, состоящие из гидрофильного ядра, ограниченного одним или несколькими липидными бислоями, в состав которых входят холестерин и нетоксичные естественные или синтетические липиды. Используются для целенаправленной доставки лекарственных веществ, ферментов, вакцин. Биологические свойства липосом определяются размером, зарядом и составом липидного бислоя.

Наночастицы – высокодисперсные, гомогенные по структуре частицы размером менее 100 нм хотя бы в одном измерении, характеризующиеся физико-химическими свойствами, отсутствующими у исходных материалов (измененные термодинамические характеристики (температура, фазовые переходы, форма «кривых плавления»); каталитическая активность; химическая реакционная способность; «квантовые» эффекты (оптический, электрический, магнитный, кристаллографический) и т.д.).

Нанопрепараты – лекарственные формы или средства медицинского назначения, содержащие наночастицы.

Нанотрубки – свернутые в цилиндр листы графена. Существуют однослойные и многослойные нанотрубки. Нанотрубки используются как каркас для создания полифункциональных наноразмерных терапевтических систем.

Неорганические наночастицы – наноразмерные объекты, состоящие из золота, серебра, гадолиния, оксида железа (магнетит), кремния, титана.

Патоцитоз – процесс эндоцитоза макрофагами гидрофобных частиц

Полимерные мицеллы – наноразмерные искусственные липидные везикулы, стенка которых, в отличие от липосом, представлена липидным монослоем.

Полимерные наночастицы – наноразмерные объекты, которые ведут себя как единое целое при транспортировке в средах организма и взаимодействии с другими объектами или структурами организма. Наночастицы классифицируются в соответствии с диаметром: ультрамалые частицы от 1 до 100 нм, мелкие частицы имеют размер от 100 до 2500 нм, и крупные частицы охватывают диапазон от 2500 и 10000 нм. Наночастицы обладают большой площадью поверхности относительно их массы.

Потоцитоз – рецептор-опосредованный транспорт непосредственно в цитозоль.

Фуллерены. Фуллерен C_{60} – включающая 60 атомов углерода сферическая замкнутая молекула, состоящая из 12 пентагональных и 20 гексагональных граней. Диаметр молекулы составляет 0,71 нм. Получены фуллерены с большим числом атомов, например фуллерены C_{70} эллипсоидной формы, а также фуллерены с меньшим числом атомов углерода, C_{28} и C_{36} . Поверхность фуллеренов обладает высоким потенциалом к образованию новых химических связей, что является основным потенциалом для функционализации этих молекул.

1.4. Список сокращений

ЛВ – лекарственное вещество

ЛД₅₀ – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных в испытываемой группе

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

НЧ – наночастицы

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РЭС – ретикуло-эндотелиальная система

$T_{1/2}$ – время полувыведения (полуэлиминации)

ФК – фармакокинетика

1.5. Общие принципы

Лекарственные препараты (ЛП), содержащие наночастицы, активно внедряются в медицинскую практику. В 1995 и 1996 году соответственно FDA и ЕМА разрешили использование в онкологии липосомальных препаратов доксорубина. Позже были созданы липосомальные препараты амфотерицина В, ципрофлоксацина, даунорубина, цитарабина, винкристина, паклитаксела, карбоплатины, топотекана, бупивакаина, содержащий наночастицы и паклитаксел препарат аброксан, наномицеллярные препараты паклитаксела, цисплатины и эпирубина. В настоящее время наноразмерные системы применяются как диагностические средства при МРТ и рентгенографии. Разрешен к применению доксил, первый препарат для контролируемой доставки доксорубина (термочувствительные липосомы).

В настоящее время этот класс ЛП привлекает пристальное внимание по двум основным причинам: во-первых, эти препараты имеют высокий потенциал для технологических прорывов, во-вторых, особенности фармакокинетики наночастиц требуют особого внимания к их безопасности.

Действительно, материалы в нанометровом диапазоне (по крайней мере один размер этих структур не превышает 100 нм) способны проявлять химические, физические и биологические свойства, отличные от низкомолекулярных соединений и структур, размер которых на порядок выше.

Например, зависимые от размера свойства или феномены могут использоваться с целью изменения биодоступности, снижения дозировки, увеличения активности препарата, уменьшения токсичности, большей активности в отношении патогенов [1].

Эти эффекты могут возникать в результате изменения химических, биологических, магнитных свойств, изменения внутренней структуры или других характеристик, присутствующих наноразмерным структурам.

Так, позитивный заряд наноразмерных липидных везикул (нановезикул) вызывает отек мозга, в то время как нейтральные или негативно заряженные структуры не оказывали подобного действия.

Модификация поверхности наноструктур сурфактантами (полиэтиленгликоль, полисорбаты) снижает токсичность *in vitro* и увеличивает время полуэлиминации и депонирование в тканях.

В этой связи характеристика потенциального риска для здоровья человека фармакологических веществ и средств медицинского применения, содержащих наночастицы, является обязательной [2,3].

Современная система доклинической токсикологической оценки ЛС, ориентированная на тестирование химических соединений, не вполне адекватна для оценки лекарственных нанопрепаратов в силу различий в характере распределения и выведения, времени экспозиции тестируемых агентов, сроках проявления возможных токсических эффектов и т.п. [3,4].

Имеющиеся в настоящее время фундаментальные исследования по нанотоксикологии недостаточны и не дают научно обоснованной базы для создания всеобъемлющего документа, регламентирующего исследование общетоксического действия фармакологических веществ и средств медицинского назначения, в состав которых входят наночастицы, в котором должны быть отражены специфические особенности исследований токсического действия нанолечевых и других средств медицинского назначения, в состав которых входят наночастицы с акцентом на прогностическую оценку возможных отдаленных последствий [4].

2. Основные особенности лекарственных препаратов, содержащих наночастицы

Наноносители лекарственных веществ изначально создавались для оптимизации химико-физических параметров, изменения некоторых фармакокинетических показателей уже созданных ЛП.

Однако со временем возникли перспективы значительно более широкого применения этих систем.

В настоящее время цели создания нанопрепаратов могут быть сформулированы как: специфическая направленная (таргетная) доставка ЛВ в организме; большая биосовместимость и безопасность препаратов; создание ЛП с более широкими границами безопасности; улучшение ФК.

2.1. Применение нанопрепаратов в медицине и биологии

- Направленная (таргетная) доставка лекарственных веществ и генов
- Тканевая инженерия, передовые технологии
- Разрушение тканей за счет нагрева
- Контрастные средства для магнитно-резонансной томографии
- Флуоресцентные биологические маркеры
- Тест-системы для определения белков
- Анализ ДНК
- Сепарация и очистка биологических материалов и молекул

2.2. Основные цели использования нанопрепаратов в клинической практике:

- Увеличить эффективность, уменьшить дозу действующего вещества и снизить токсичность лекарственной терапии
- Уменьшить потенциальную токсичность или увеличить стабильность лекарственных веществ за счет включения в наноструктуры.
- Обеспечить направленный транспорт лекарственных веществ с преимущественным распределением действующего вещества в заданной области
- Создать системы с контролируемым высвобождением ЛВ
- Улучшить транспорт ЛВ через биологические мембраны

2.3. Потенциальные осложнения при использовании нанопрепаратов, обусловленные путем введения

Ингаляционный

- Локальная токсичность при вдыхании

- Распределение и депонирование в тканях органов дыхания

- Системная биодоступность

Подкожный

- Сенсибилизация

Конъюнктивальный, интравитреальный

- Задержка в стекловидном теле

Внутри

- Увеличение биодоступности

Кожный

- Увеличение кожной и системной биодоступности

- Увеличение фолликулярного депонирования

- Доставка к локальным лимфатическим узлам

- Фототоксичность

Внутривенный

- Влияние на компоненты крови

- Риск постинъекционного инфицирования

- Потенциальный риск попадания в ранее недоступные органы и ткани.

2.4. Особенности анализа абсорбции, распределения, метаболизма и элиминации

· различия в профиле всасывания, распределения, метаболизма и выведения для наночастиц и частиц большего размера

· адекватность используемого метода определения лекарственных веществ в крови и тканях исследуемым наночастицам (приемлемость метода, лимиты возможностей)

· точность метода, особенно если количество введенного препарата незначительно, то есть можно ли обнаружить 100% введенного препарата

· точность определения клиренса при целенаправленной (таргетной) доставке

· избирательная доставка нанопрепаратов в ткани, особенности описания этого процесса

· надежная метка, позволяющая определять нанопрепараты в процессе абсорбции, распределения, метаболизма и элиминации

2.5. Необходимый объем доклинических исследований для оценки безопасности наночастиц

· Фармакодинамика лекарственных препаратов, содержащих наночастицы

· Диапазон терапевтических доз, токсические дозы

· Токсикология, включая поведенческие реакции и гистопатологию

· Всасывание, распределение, метаболизм и выведение

· Генотоксичность

· Тератогенное и эмбриотоксическое действие

· Иммунотоксичность

· Влияние на канцерогенез

· Иные специфические виды токсического действия.

2.6. Общая фармакокинетическая характеристика нанопрепаратов

В настоящее время существуют несколько типов наноразмерных систем, в которых ЛВ размещено внутри или на поверхности носителя (дендримеры, липосомы, мицеллы, полимерные наночастицы).

Эти системы обеспечивают ряд фармакокинетических преимуществ, таких как специфическая доставка, высокая метаболическая стабильность, хорошая проницаемость через мембраны, повышенная биодоступность, пролонгирование действия.

Изменяя биофармацевтические и фармакокинетические параметры, наноразмерные системы позволяют получить новые ЛП с заданными свойствами.

Физико-химические свойства систем, такие как размер, поверхностный заряд, гидрофобность влияют на характеристики всасывания с поверхности слизистой.

Для меньших по размеру наноносителей более характерен трансцеллюлярный транспорт через эпителий, наночастицы могут использовать эндоцитоз за счет кавеоларного или клатринового механизмов эндоцитоза, потоцитоза, пиноцитоза и паточитоза [5].

Большие по размеру наночастицы опсонизируются и удаляются из кровотока за счет макрофагов РЭС.

В связи с этим, при разработке дизайна наносистем необходимо минимизировать опсонизацию и увеличить время циркуляции наночастиц.

Это может быть достигнуто за счет покрытия поверхности наночастиц гидрофильным полимером/сурфактантом.

Другой возможностью является создание наночастиц из биodeградируемых кополимеров с гидрофильным сегментом, как ПЭГ, полиэтиленоксид, полоксамеры, поллоксамин, полисорбат 80 (Твин 80) [6].

Разрабатываемые наносистемы доставки ЛВ создаются для применения инъекционно, трансдермально, внутрь. В последние годы активно исследуются системы для применения в аэрозоле.

3. Общие характеристики безопасности нанопрепаратов

Несмотря на функциональную привлекательность и перспективность нанопрепаратов, их безопасность требует подтверждения.

Сведения о токсичности нанопрепаратов ограничены, но их объем постоянно увеличивается.

Наночастицы способны уменьшать токсичность химиотерапевтических средств или других препаратов с узким терапевтическим индексом.

Вместе с тем, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что определенные типы наночастиц обладают цитотоксичностью, вызывают аллергические и воспалительные реакции.

Некоторые наночастицы способны образовывать активные формы кислорода, свободные радикалы, приводящие к оксидативному стрессу, повреждать ДНК, вызывать фиброз.

Другой проблемой, связанной с нанопрепаратами, является их накопление внутри клеток, особенно при длительном применении.

Верхняя граница, вызывающего токсическое действие размера наночастиц, точно не установлена, но находится в пределах 65-200 нм.

Токсичность наночастиц является в высшей степени сложной и полифункциональной и зависит от физико-химических свойств.

Размер наночастиц, по-видимому, является более важным параметром для развития токсических эффектов, чем их состав.

Не исключено, что площадь поверхности наночастиц может быть важнее их веса.

Положительно заряженные частицы могут нарушать пролиферацию, дифференциацию эпителиальных клеток, а также стимулировать апоптогенные структуры.

Поликатионные структуры иногда стимулируют некроз и апоптоз.

Реактивность структур на поверхности НЧ может приводить к химическим повреждениям окружающих тканей.

Так, при вдыхании НЧ способны вызывать воспаление в ткани легкого. Нанотрубки и нановолокна при попадании в дыхательные пути могут приводить к развитию фиброза.

Взаимодействие НЧ с кожей также требует внимания в связи с их применением в косметических средствах и солнцезащитных кремах.

Проникновение НЧ в кожу также зависит от физико-химических свойств с одной стороны, а с другой – от состояния кожи.

Неоднозначные результаты относительно токсичности НЧ в отношении кожного эпителия указывают на необходимость более тщательного исследования этого взаимодействия.

Ограниченное число исследований посвящено системной токсичности НЧ.

Большинство таких работ связаны с оценкой острой токсичности, определению показателя ЛД₅₀.

Принимая во внимание, что НЧ обычно захватываются РЭС, мишенями становятся органы, входящие в эту систему, печень и селезенка.

Однако, современный дизайн исследования предусматривает модификацию поверхности НЧ биосовместимыми сурфактантами, что снижает захват клетками РЭС и приводит к сдвигу распределения НЧ в пользу других органов [7,8,9].

3.1. Дендримеры

Дендримеры являются эффективной системой доставки ЛВ. Эти сложные полимеры способны доставлять доксорубин и другие цитотоксические средства в солидные опухоли и уменьшать накопление цитостатиков в неопухолевых тканях.

Дендримеры потенциально могут быть использованы для солибилизации и таргетной доставки флубипрофена, метотрексата и пироксикама.

Кроме того, исследуется их потенциал как средств доставки сосудистого эндотелиального фактора роста, фолатов, эпидермального фактора роста и моноклональных антител.

Вместе с тем, большинство дендримеров обладают токсическим и гемолитическим действием вследствие положительного заряда поверхности.

Анионные и модифицированные дендримеры, маскирующие катионные группировки, обладают менее выраженной гемолитической активностью [10].

3.2. Наноразмерные субстанции (нанокристаллы)

Применение наноразмерных субстанций позволяет увеличить на порядок такие показатели как максимальная концентрация (C_{max}), биодоступность по сравнению с субстанциями микронного диапазона.

Нанокристаллы соединений с рН в кислом диапазоне более эффективно изменяли

фармакокинетические параметры, чем соединения, относящиеся к основаниям.

Механизмы повышения биодоступности при приеме внутрь связаны с оптимизацией растворимости, биоадгезией нанокристаллов к стенке кишечника, трансцеллюлярным захватом.

Нанокристаллы могут быть использованы для трансдермальной, альвеолярной и транскорнеальной доставки.

Показано, что нанокристаллические формы НПВС обладают менее выраженным ulcerогенным потенциалом.

3.3. Липосомы

При оптимизации липосомального транспорта необходимо было решить несколько фармакокинетических проблем, включающих неспецифический захват тканями РЭС в период от нескольких минут до нескольких часов, быстрый клиренс и опсонизацию.

На ФК липосомальных препаратов оказывает влияние размер, заряд, состав стенки липосом, а также доза и путь введения.

Модификация поверхности липосом с помощью ПЭГ позволяет снизить опсонизацию и клиренс. «Пэгилированные» липосомы обеспечивают больший $T_{1/2}$ и способны проникать через стенку опухолей, обеспечивая эффективную доставку противоопухолевых препаратов к органу-мишени.

Активное использование липосом обусловлено рядом факторов: высокий потенциал включения гидрофильных и гидрофобных соединений; защита включенного вещества от внешних воздействий, возможность функционализации за счет конъюгации специфических лигандов на поверхность; возможность пролонгирования циркуляции в кровеносном русле; контролируемые размер и заряд поверхности [11,12,13].

3.4. Мицеллы

Мицеллярные наночастицы могут быть альтернативой липосомам при пассивном и направленном транспорте ЛВ в организме. После внутривенного введения мицеллы способны изменять ФК включенного в них препарата, обеспечивая лучшие клинические показатели.

Кроме того, могут использоваться в виде глазных капель, так как предотвращают быструю потерю препарата на уровне прекорнеальной зоны и за счет этого обеспечивают большую продолжительность действия.

3.5. Полимерные наночастицы

Полимерные наночастицы имеют размер в диапазоне 10-1000 нм. ЛВ может включаться в полимерную матрицу или сорбироваться на поверхности частиц, что в обоих случаях предотвращает энзиматическое разрушение препарата.

Полимерные наночастицы, как правило, покрыты неионным сурфактантом, что в значительной степени снижает риск иммунологических взаимодействий, таких как опсонизация, а также реакции с химическими структурами нанопрепарата за счет Ван-дер-Ваальсовых или водородных взаимодействий.

Разрешенный к применению в клинической практике нанопрепарат паклитаксела на основе альбуминовых НЧ абраксан обладает более высокой эффективностью и менее выраженным нежелательным действием, чем обычный препарат паклитаксела [14].

4. Условия проведения исследований

Работа с фармакологическими веществами, имеющими в своем составе наночастицы, должна проводиться высококвалифицированными специалистами в вытяжных шкафах, оборудованных ULPA фильтрами.

Условия проведения работы должны соответствовать требованиям, указанным в Приказе Роспотребнадзора от 19.07.2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

4.1. Общие положения

Токсикологические исследования обязательны для всех нанопрепаратов, независимо от того, оригинальное или известное фармакологическое вещество или какой-то иной материал использованы в их составе.

Если лекарственный нанопрепарат содержит наночастицы и/или вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т. п.), не разрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из них подвергают отдельному токсикологическому исследованию.

При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают токсичность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

При изменении способа получения фармакологического вещества или лекарственной формы проводится повторная токсикологическая оценка на одном наиболее чувствительном виде животных, который определяется исходя из данных первоначальных исследований.

Недопустимо измельчать лекарственные формы, предназначенные для регулируемого высвобождения вещества, если это специально не предусмотрено разработчиком [15,16].

При изменении количественного соотношения ингредиентов в лекарственной форме или увеличении дозировки действующего вещества, ведущих к изменению фармакодинамики и фармакокинетики нанопрепарата, следует провести повторную оценку его токсичности на одном наиболее чувствительном виде животных, который определяется исходя из данных первичных исследований [17].

4.2. Сведения о лекарственном нанопрепарате

Для проведения токсикологического изучения необходимо иметь характеристику субстанции (предварительную нормативную документацию; проект ФС) фармакологического вещества (Приложение 1), согласно которой оно идентифицируется, устанавливаются пределы содержания примесей, определяется его стабильность.

Дается также характеристика лекарственного нанопрепарата и вспомогательных веществ, использованных при ее получении (наночастицы, растворители, наполнители, стабилизаторы и др.).

Следует иметь данные о способе приготовления раствора для введения, растворимости, гидрофобности или липофильности фармакологического вещества, наночастиц, а также данные о химическом составе, адгезивности, размере, форме, поверхностных характеристиках (заряд), химической реактивности наночастиц, их биodeградации и порядка их организации в ЛП. Желательно иметь данные об изменении свойств наночастиц под действием температуры, магнитного поля, облучения и при попадании в биологические жидкости.

Сведения о структуре, физико-химических свойствах, растворимости, условиях хранения, фармакологической активности с представлением данных экспериментальных исследований, предполагаемых дозах и путях введения в клинику, а также другая значимая для проведения исследования информация о свойствах субстанции фармакологического вещества или

его лекарственной формы предоставляются разработчиком.

Дополнительно к обычно употребляемым размерностям в мг на 1 кг массы (мг/кг) или мг на 1м² (мг/м²) поверхности тела животного дозы лекарственного нанопрепарата целесообразно выражать как отношение количества наночастиц к массе препарата (10¹² мг⁻¹) и отношение площади поверхности наночастиц к массе препарата (см²/мг) [18].

4.3. Количественная и качественная оценка наночастиц в лекарственном препарате

Гигиеническое нормирование содержания наночастиц в ЛП требует наличия методов выявления, идентификации и количественного определения наночастиц.

Одним из методов, существующих в настоящее время, наиболее разработанным и надежным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму, кристаллическую структуру, химический состав электронноплотных веществ в диапазоне размеров 1–100 нм и более.

Лекарственное вещество в порошкообразной форме растворяют в соответствии с указаниями в инструкции по применению препарата, в жидкой форме – суспензируют. Проводят электронно-микроскопические исследования, анализируя структурные и морфометрические характеристики фармакологического вещества.

Токсические свойства наночастиц зависят от их размеров и структурной организации, их заряда, состояния их поверхности, реактивности структур, составляющих поверхность наночастицы. Заряд и состояние поверхности наночастиц способны влиять на распределение в организме, захват клетками ретикуло-эндотелиальной системы, что, в конечном итоге, определяет фармакокинетику этих структур [19,20].

5. Особенности оценки «острой» токсичности нанопрепаратов

Исследуется «острая» токсичность как самого фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, так и его составляющих по отдельности: наночастиц, активного вещества и других компонентов лекарственной формы, если они не были ранее разрешены к использованию в составе ЛС.

Результаты исследований показывают, что проявление токсических свойств наноча-

стиц в значительной мере зависит от пути их поступления в организм. Это означает, что суждение об острой токсичности нанопрепаратов может базироваться исключительно на результатах, полученных в исследованиях, обеспечивающих тот путь введения, который будет использоваться в клинике.

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности нанопрепаратов должна составлять не менее 30 дней после последнего случая гибели животного. В первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением [18].

Остальные параметры и процедуры оценки острой токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличаются от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС».

6. Исследование кумуляции нанопрепаратов

Исследование кумулятивного действия фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, является проблемой, не получившей должного освещения в современной литературе.

Очевидно, что применение традиционных подходов, не может быть адекватным в связи с принципиально иной динамикой развития токсических эффектов нанопрепаратов по сравнению с химическими соединениями в макродисперсной форме [21, 22].

В то же время кумуляция токсических эффектов неизбежно будет выявляться в ходе проведения исследований хронической токсичности, что позволяет временно отложить вопрос о специальном изучении кумулятивного действия нанопрепарата.

При этом принципиальным фактором является не только степень дисперсности наночастиц, но также составляющий их материал.

Так, большие по размеру липосомы, состоящие из фосфолипидов, метаболизируются значительно быстрее, чем меньшие по размеру (около 1 нм) фуллерены. При этом фуллерены практически не метаболизируются, что приводит к накоплению последних в клетках РЭС и почках [23-26].

Исследование кумуляции требует отказа от стандартного подхода, основанного на предыдущем опыте, полученном при изучении лекарственных препаратов, содержащих наночастицы.

Так, обладающие низкой токсичностью дендримеры способны вызывать гемолиз.

Сходные по структуре или размеру наноструктуры могут обладать различной тропностью к тканям.

Так, сходные по строению фуллерены и нанотрубки (представляют графитовые структуры) обладают различным распределением в организме. Особенностью нанотрубок является тропность к тканям дыхательных путей, и легких [27-29].

7. Особенности оценки токсичности нанопрепаратов в хроническом эксперименте

В экспериментах по изучению хронической токсичности используют три дозы нанопрепарата. Дозы рассчитываются по количеству действующего вещества в составе лекарственной формы. Путь введения аналогичен клиническому; если рекомендуется несколько путей введения, то следует провести оценку при введении нанопрепарата всеми используемыми способами. Введение максимальной дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов и гибель части животных. Эта доза может быть определена из данных по острой токсичности. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения. Третья доза является промежуточной.

Фармакологические вещества, предназначенные для ежедневного применения у человека, вводят лабораторным животным 7 дней в неделю.

В связи с предполагаемым разнообразием возможных нанолечеств, их различных вариантов фармакокинетических характеристик и проявления токсических эффектов определение длительности введения нанолечеств является сложной задачей, не имеющей удовлетворительного научного решения из-за отсутствия достаточных фундаментальных знаний по общей токсикологии наночастиц [30-31].

По аналогии с правилами, действующими при определении продолжительности введения фармакологически активных химических соединений в макродисперсной форме, представляется целесообразным связать в исследовании продолжительность введения фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, с длительностью планируемого клинического курса применения в соответствии с таблицей, приведенной ниже, при условии обязательной постановки «отставленных» групп и срока наблюдения в «отставленных» группах не менее 60 дней.

Приложение №1

Схема отчета об исследовании общетоксического действия нанопрепарата

Отчет должен содержать следующие разделы: титульный лист, список исполнителей, оглавление, реферат, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты проведенных исследований, заключение, список литературы, приложение.

Титульный лист: содержит название организации-исполнителя, утверждение отчета, заверенное подписью руководителя учреждения и печатью организации, название отчета, должность, фамилию, имя, отчество и подпись руководителя проведенных исследований.

Список исполнителей: ответственный исполнитель, исполнители — фамилия, имя, отчество, должность, степень, звание, подпись.

Оглавление: перечень разделов с указанием страниц отчета.

Введение: цели и задачи исследования.

Обзор литературы: информация об оригинальном препарате, нанопрепарате или литературные сведения о воспроизведенном препарате.

Материалы и методы: физико-химическая характеристика субстанции и лекарственной формы, их соответствие проекту нормативной документации (ФСП, ФС или количественный и качественный состав лекарственной формы воспроизведенного ЛП, серия, соответствие проекту ФСП).

Характеристика использованных лабораторных животных (источник получения, масса, возраст, пол, условия содержания). Схема эксперимента, обоснование выбранных доз. Описание методов исследования и метода статистической обработки данных.

Результаты проведенных исследований: описание острой токсичности и хронической токсичности в соответствии с полученными достоверными изменениями изученных показателей и результатами патоморфологических исследований, способ эвтаназии животных.

Заключение: краткое обсуждение полученных результатов, прогноз возможных побочных эффектов, рекомендуемые ограничения или необходимый контроль при проведении КИ.

Список литературы.

Приложения: таблицы индивидуальных показателей и результаты их статистической обработки по всем изученным тестам, индивидуальное описание гистологических изменений органов и тканей лабораторных животных.

Приложение 1

Сведения о фармакологическом веществе

Наименование продукции _____

Номер серии (партии) _____

Количество (масса, объем), ед. измерения: _____

Дата изготовления продукции _____

Исследования (анализы) проведены _____

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bleeker EA, de Jong WH, Geertsma RE, et al. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: science to support policy making. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013;65(1):119–125.
2. Chang HI, Yeh M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:49–60.
3. Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. *Environ Health Perspect*. 2011;119(3):a120–a125.
4. Vega-Villa KR, Takemoto JK, Ybcez JA, Remsberg CM, Forrest ML, Davies NM. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60(8):929–938.
5. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Prřat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release*. 2006;116(1):1–27.
6. Choi HS, Frangioni JV. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging*. 2010;9(6): 291–310.
7. Wick P, Manser P, Limbach LK, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 2007;168(2):121–131.
8. SZiembra B, Matuszko G, Bryszewska M, Klajnert B. Influence of dendrimers on red blood cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2012;17(1):21–35.
9. Stern ST, McNeil SE. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci*. 2008;101(1):4–21.
10. Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J Pharm Sci*. 2007;96(10): 2547–2565.
11. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*. 2013;166(2):182–194.
12. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):615–62.
13. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1–2):113–14.
14. Oberdřrster G, Maynard A, Donaldson K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol*. 2005;2.
15. NanoMarkets. Доступно на [nanomarkets.net/images/uploads/ NMThinFilmPrintedBatteries_08.pdf](http://nanomarkets.net/images/uploads/NMThinFilmPrintedBatteries_08.pdf) Файл PDF.
16. Kermanizadeh A, Gaiser BK, Johnston H, D et al. Toxicological effect of engineered nanomaterials on the liver. *Brit. J. Pharmacol*. 2014, 171: 3980–3987.
17. Kettiger H, Schipanski A, Wick P. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, 8: 3255–3269.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Особенности изучения общетоксического действия лекарственных средств и средств медицинского назначения, содержащих наночастицы. 2012. Издание ФГБУ ЦНЦЭМСПц.
19. Fleischer CC, Payne CK. Nanoparticle surface charge mediates the cellular receptors used by protein-nanoparticle complexes. *J Phys Chem B*. 2012;116(30):8901–8907.
20. Asha Rani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009;3(2):279–290.
21. Shim J, Seok Kang H, Park WS, et al. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release*. 2004;97(3):477–484.
22. Aggarwal N, Goindi S. Preparation and in vivo evaluation of solid lipid nanoparticles of griseofulvin for dermal use. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9(4):564–576.
23. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(8):469–478.
24. Gasser M, Rothen-Rutishauser B, Krug HF, et al. The adsorption of biomolecules to multi-walled carbon nanotubes is influenced by both pulmonary surfactant lipids and surface chemistry. *J Nanobiotechnology*. 2010;8:31.
25. Gessner A, Waicz R, Lieske A et al. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm*. 2000;196(2):245–249.
26. Downs TR, Crosby ME, Hu T, et al. (2012). Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not. *Mutat Res* 745: 38–50.
27. Аляутдин РН, Романов БК, Меркулов ВА. Особенности распределения фуллереновых наночастиц в организме при проведении доклинических исследований. Безопасность и риск фармакотерапии. 2015. №3. 24–31.
28. Dragoni S, Franco G, Regoli M, Bracciali M et al. (2012). Gold nanoparticles uptake and cytotoxicity assessed on rat liver precision cut slices. *Toxicol Sci* 128: 186–197.
29. Sadauskas E, Jacobsen NR, Danscher G, Stoltenberg M et al. (2009). Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. *Chem Cent J* 3: 16. doi: 10.1186/1752-153X-3-16.

30. Fadeel B (2012). Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune response. *Swiss Med Wkly* 142: w13609. doi: 10.4414/sm.w.2012.13609.
31. Kim S, Choi JE, Choi J et al. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro* 23: 1076–1084.

REFERENCES:

1. Bleeker EA, de Jong WH, Geertsma RE, et al. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: science to support policy making. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2013;65(1):119–125.
2. Chang HI, Yeh M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:49–60.
3. Kessler R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient. *Environ Health Perspect.* 2011;119(3):a120–a125.
4. Vega-Villa KR, Takemoto JK, Ybcez JA, Remsberg CM, Forrest ML, Davies NM. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(8):929–938.
5. des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Prŕiat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release.* 2006;116(1):1–27.
6. Choi HS, Frangioni JV. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging.* 2010;9(6): 291–310.
7. Wick P, Manser P, Limbach LK, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2007;168(2):121–131.
8. Sziemba B, Matuszko G, Bryszewska M, Klajnert B. Influence of dendrimers on red blood cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2012;17(1):21–35.
9. Stern ST, McNeil SE. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci.* 2008;101(1):4–21.
10. Devalapally H, Chakilam A, Amiji MM. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. *J Pharm Sci.* 2007;96(10): 2547–2565.
11. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release.* 2013;166(2):182–194.
12. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615–62.
13. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;385(1–2):113–14.
14. Oberdŕrster G, Maynard A, Donaldson K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2005;2.
15. NanoMarkets. Доступно на [nanomarkets.net/images/uploads/ NMThinFilmPrintedBatteries_08.pdf](http://nanomarkets.net/images/uploads/NMThinFilmPrintedBatteries_08.pdf) Файл PDF.
16. Kermanizadeh A, Gaiser BK, Johnston H, D et al. Toxicological effect of engineered nanomaterials on the liver. *Brit. J. Pharmacol.* 2014, 171: 3980–3987.
17. Kettiger H, Schipanski A, Wick P. Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *International Journal of Nanomedicine.* 2013, 8: 3255–3269.
18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Особенности изучения общетоксического действия лекарственных средств и средств медицинского назначения, содержащих наночастицы. 2012. Издание ФГБУ «НЦЭМСП».
19. Fleischer CC, Payne CK. Nanoparticle surface charge mediates the cellular receptors used by protein-nanoparticle complexes. *J Phys Chem B.* 2012;116(30):8901–8907.
20. Asha Rani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 2009;3(2):279–290.
21. Shim J, Seok Kang H, Park WS, et al. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release.* 2004;97(3):477–484.
22. Aggarwal N, Goindi S. Preparation and in vivo evaluation of solid lipid nanoparticles of griseofulvin for dermal use. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9(4):564–576.
23. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(8):469–478.
24. Gasser M, Rothen-Rutishauser B, Krug HF, et al. The adsorption of biomolecules to multi-walled carbon nanotubes is influenced by both pulmonary surfactant lipids and surface chemistry. *J Nanobiotechnology.* 2010;8:31.
25. Gessner A, Waicz R, Lieske A et al. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm.* 2000;196(2):245–249.
26. Downs TR, Crosby ME, Hu T, et al. (2012). Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not. *Mutat Res* 745: 38–50.
27. Alyautdin RN, Romanov BK, Merculov VA. The distribution of fullerene nanoparticles in the body in preclinical studies. *Safety and Risk of Pharmacotherapy.* 2015;(3): 24–31.

28. Dragoni S, Franco G, Regoli M, Bracciali M et al. (2012). Gold nanoparticles uptake and cytotoxicity assessed on rat liver precision cut slices. *Toxicol Sci* 128: 186–197.
29. Sadauskas E, Jacobsen NR, Danscher G, Stoltenberg M et al. (2009). Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. *Chem Cent J* 3: 16. doi: 10.1186/1752-153X-3-16.
30. Fadeel B (2012). Clear and present danger? Engineered nanoparticles and the immune response. *Swiss Med Wkly* 142: w13609. doi: 10.4414/smw.2012.13609.
31. Kim S, Choi JE, Choi J et al. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro* 23: 1076–1084.

ОБ АВТОРАХ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Аляутдин Ренад Николаевич. Заместитель директора Центра экспертизы безопасности лекарственных средств, д-р мед. наук.

Романов Борис Константинович. Директор Центра экспертизы безопасности лекарственных средств, д-р мед. наук.

AUTHORS:

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation. 8 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

Alyautdin RN. Deputy director of Center of Expertise of Drug Safety. Doctor of Medical Sciences.

Romanov BK. Director of Center of Expertise of Drug Safety. Doctor of Medical Sciences.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ:

Аляутдин Ренад Николаевич,
Alyautdin@expmed.ru

Статья поступила 21.09.2015 г.

Принята к печати 23.09.2015 г.