

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044573**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.07</p> <p>(21) Номер заявки
201991489</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2017.12.19</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 41/00</i> (2006.01)
<i>A61P 25/00</i> (2006.01)
<i>A61N 2/00</i> (2006.01)
<i>A61N 1/36</i> (2006.01)
<i>A61N 1/04</i> (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ИЛИ АГРЕГАТА НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО НАРУШЕНИЯ

- | | |
|---|--|
| <p>(31) 16306750.7</p> <p>(32) 2016.12.21</p> <p>(33) EP</p> <p>(43) 2019.12.30</p> <p>(86) PCT/EP2017/083533</p> <p>(87) WO 2018/114945 2018.06.28</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НАНОБИОТИКС (FR)</p> <p>(72) Изобретатель:
Мер Мари-Эдит, Поттье Аньес, Леви Лоран (FR)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2006126771
RAKESH GUDURU ET AL.:
"Magnetolectric 'spin' on stimulating the brain",
NANOMEDICINE, vol. 10, no. 13, 1 July 2015
(2015-07-01), pages 2051-2061, XP055382324, GB
ISSN: 1743-5889, DOI: 10.2217/nnm.15.52 abstract
page 2055, column 1, paragraph 1 - page 2058, column
2, paragraph 2 page 2051, column 1, paragraph 1 -
column 2, paragraph 1
US-A1-2013317279
US-A1-2013320273</p> |
|---|--|

- (57) Изобретение относится к лечению неврологических расстройств, более конкретно к применению наночастицы или агрегата наночастиц для предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, когда наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию электрического поля, где материал наночастицы или агрегата наночастиц выбран из проводникового материала, выбранного из металла, имеющего стандартный потенциал восстановления E° выше 0,2, и органического материала, имеющего смежные sp^2 -гибридизованные углеродные центры в его структуре, полупроводникового материала с E_g запрещенной зоны ниже 3,0 эВ, изолирующего материала с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изолирующего материала с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже, где электрическое поле применяют посредством глубокой стимуляции головного мозга, транскраниальной электрической стимуляции или транскраниальной магнитной стимуляции. Также описываются композиции и наборы, содержащие такие наночастицы и/или агрегаты наночастиц, а также их применения.

044573
B1

044573
B1

Настоящее изобретение относится к области медицины и, в частности, к лечению неврологических нарушений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению наночастиц или агрегата наночастиц для предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, когда наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию электрического поля/стимула, где материал наночастицы или агрегата наночастиц выбран из проводникового материала, полупроводникового материала, изоляционного материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изоляционного материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже. Кроме того, описываются композиции и наборы, содержащие такие наночастицы и/или агрегаты наночастиц, а также их применение.

Уровень техники

Неврологические нарушения являются важнейшей проблемой здравоохранения (Neurological disorders public health challenges. WHO, 2006). Нарушение функции нейрональных сетей может иметь различное происхождение. Болезнь Паркинсона представляет собой двигательное нарушение, вызываемое гибелью дофаминовых нейронов в черной субстанции, расположенной в среднем мозге. Инсульт представляет собой блокаду кровоснабжения головного мозга. Без кислорода нейроны в пораженной области погибают, и часть тела, контролируемая этими клетками, не может функционировать. Болезнь Гентингтона представляет собой генетическое нарушение. Эпилепсия представляет собой нарушение, вызываемое аномальным возбуждением больших групп нейронов в различных областях головного мозга. Болезнь Альцгеймера представляет собой нейродегенеративное нарушение, характеризующееся гибелью нейронов в гиппокампе, коре головного мозга и других областях головного мозга. Причины расстройств аутистического спектра являются многофакторными: генетическими, внешними и т.д.

Неврологические нарушения можно классифицировать в зависимости от первичных симптомов, от которых страдают пациенты. Наблюдается три основных типа симптомов: двигательные нарушения, психиатрические нарушения (настроения/социальные) и когнитивные нарушения, как дополнительно объяснено в настоящем описании ниже.

Двигательные нарушения охватывают тремор, гипокинезию, такую как брадикинезия или дискинезия, скручивание мышц, ригидность, постуральную неустойчивость, феномен замерзания походки, и т.д. Заболевания, проявляющиеся двигательными нарушениями, включают, главным образом, болезнь Паркинсона, дистонию, эпилепсию, болезнь Гентингтона и синдром Туретта.

Психиатрические расстройства представляют собой различные заболевания, демонстрирующие симптомы нарушения настроения/социального нарушения. Неполный перечень включает расстройства аутистического спектра, шизофренические расстройства, биполярные расстройства, депрессивные расстройства, тревожные расстройства, обсессивно-компульсивные расстройства, связанные с употреблением веществ и/или обусловленные пристрастием нарушения (определения из Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 2013, fifth edition, the American Psychiatric Association). У некоторых пациентов, страдающих от двигательных нарушений, таких как болезнь Паркинсона и дистония, могут развиваться психиатрические нарушения на поздней стадии заболеваний.

Когнитивные расстройства присутствуют при многих, или даже при всех, психических расстройствах (например, шизофрения, биполярные расстройства). В категорию когнитивных расстройств входят только расстройства, основными признаками которых являются когнитивные признаки. Когнитивные расстройства влияют на повседневную жизнь пациентов: выполнение простых задач осложнено. Деменция является репрезентативным когнитивным расстройством и является общим термином для снижения умственных способностей, достаточно тяжелого, чтобы нарушать повседневную жизнь. Болезнь Альцгеймера является особым типом деменции, имеющим с нейродегенеративный аспект.

Неврологические нарушения лечат, когда это возможно, лекарственными средствами, которые действуют на регуляцию уровня нейротрансмиттеров в головном мозге и на контроль взаимодействий с их специфическими рецепторами нейротрансмиттеров. Основными вовлеченными нейротрансмиттерами являются: глутамат, γ -аминомасляная кислота (GABA), дофамин и ацетилхолин.

Нейротрансмиттеры глутамат и GABA представляют особый интерес, поскольку они играют ключевую роль в увеличении (Platt et al., *The Veterinary Journal*, 2007, 173, 278-286: The role of glutamate in central nervous system health and disease - a review) и в уменьшении нейрональной возбудимости, соответственно (Holmes et al., *Mental Retardation and Developmental Disabilities*, 1995, 1, 208-219: Role of glutamate and GABA in the pathophysiology of epilepsy). Дофамин вовлечен в несколько функций головного мозга: контроль движений через базальные ганглии (ненадлежащий уровень дофамина в базальных ганглиях приводит к неконтролируемым движениям), поведение, направленное на поиск доставляющей удовольствие награды (нарушение может приводить к дисфункциональному пристрастию), когнитивная функция (нарушения дофамина в лобных долях может приводить к снижению нейрокогнитивных функций) и т.д. (Alcaro et al., *Brain Res. Rev.*, 2001, 56(2), 283-321: Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective). Ацетилхолин представляет собой нейротрансмиттер, вовлеченный в обучение и память на уровне центральной нервной системы (Hasselmo et al., *Curr Opin Neurobiol*, 2006, 16(6), 710-715: The role of acetylcholine in learning and memory).

Распространенным лекарственным средством, предназначенным для смягчения двигательных симптомов болезни Паркинсона, является леводопа, которая преобразуется в дофамин в головном мозге и посредством этого помогает сбалансировать дефицит дофамина. Леводопа ассоциирована с карбидопой, которая помогает избежать преобразование леводопы в дофамин во всем организме.

Одной из проблем лечения леводопой является феномен "включения-выключения", который приводит к фазам неподвижности и несостоятельности, ассоциированным с депрессией, чередующимся с эйфорией (Lees et al., *J Neurology Neurosurgery Psychiatry, Special Supplement*, 1989, 29-37: The on-off phenomenon). Проблемой является отсутствие ответа на это лечение у пациентов на поздней стадии болезни Паркинсона (Fabri et al., *Parkinsonism and related disorders*, 2016: Do patients with late-stage Parkinson's disease still respond to levodopa?). Другими распространенными лекарственными средствами для лечения симптомов нейропсихиатрических нарушений, таких как "позитивные" симптомы, бред и галлюцинации при шизофрении являются антипсихотические лекарственные средства.

Однако терапевтические способы лечения симптомов неврологических нарушений с помощью лекарственных средств являются неспецифическими и по существу они могут индуцировать тяжелые неблагоприятные явления. Кроме того, может возникать рефрактерность к используемому лекарственному средству.

По мере продвижения в постижении нейронауки, головной мозг стали понимать как электрическую сеть, кодирующую и передающую информацию через электрические провода - нейроны. Взаимосвязь между нейронами является простой и сложной одновременно: простой, поскольку в основе ее лежит вход/выход ионов в нейронах, который вызывает потенциалы действия (или "спайк" электрической активности); сложной, поскольку сеть головного мозга состоит из сотен миллиардов нейронов, которые образуют блоки, узлы и модули, которые демонстрируют скоординированные взаимодействия в различном пространственном и временном масштабе (Fornito et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 2015, 16, 159-172: The connectomics of brain disorders). Нейронная передача зависит от анатомических компонентов, которые соединяют индивидуальные нейроны (структура), и от процесса передачи информации (функция). Оба аспекта влияют на общую работу нервной системы. Нейрональные взаимодействия осуществляются посредством колебаний паттерна электрической активности головного мозга, которые поддаются определению, обычно с помощью электроэнцефалограммы (ЭЭГ). Наблюдает различные полосы частот колебаний: дельта, тета, альфа, бета, гамма (Ward et al., *Trends in Cognitive Sciences*, 2003, 7(12), 553-559: Synchronous neural oscillations and cognitive processes). Структурно наиболее поразительным нейроанатомическим признаком головного мозга являются обширные связи между нейронами, которые отражают важность передачи информации между нервами. Синхронизация колебаний ("синхрония") между одной областью головного мозга и другой по-видимому является последним уровнем кодирования информации [первый уровень (нейрон): потенциалы действия; второй уровень (нейрональная сеть(и)): нейрональные колебания] путем осуществления пространственно-временной координации (Engel et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, 2, 704-716: Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing). Важно, что появляются доказательства, что правильно сбалансированный паттерн синхронизации и десинхронизации в пространстве и времени является фундаментальным для функциональной работы нервной системы (Schnitzler et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6, 285-296: Normal and pathological oscillatory communication in the brain).

Аномальные процессы синхронизации (слишком высокая и/или слишком длительная синхрония, т.е. также называемая гиперсинхронией, или слишком низкая синхрония, также называемая сниженной синхронией), ассоциированы с несколькими нарушениями головного мозга, такими как эпилепсия, шизофрения, деменция и болезнь Паркинсона (Schnitzler et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6, 285-296: Normal and pathological oscillatory communication in the brain).

В настоящее время модулирование профиля электрической активности нейронов (нейромодулирование) может быть индуцировано посредством электрической стимуляции. В современных способах обеспечения электрического стимула в головном мозге используется как прямая электрическая стимуляция, так и индукция электрического поля посредством применения электрического тока через магнитную спираль. Поскольку определенные неврологические нарушения поражают глубокие области головного мозга и поскольку проникновение электрического поля вглубь является слабым, осуществляется хирургическая имплантация электродов внутрь головного мозга для непрерывной доставки электрических стимулов, и она представляет собой технологию "глубокой стимуляции головного мозга" (DBS). Ее эффективность зависит от параметров, используемых для стимуляции, особенно частоты. В 1987 году было обнаружено, что высокочастотная стимуляция (≥ 100 Гц) вентрального медиального (VIM) ядра имплантированными электродами облегчает связанные с тремором симптомы у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона (Benabid et al., *Applied Neurophysiology*, 1987, 50, 344-346: Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease). Также было показано, что у обезьян высокочастотная стимуляция (>100 Гц), по сравнению с низкочастотной стимуляцией (<50 Гц), позволяет изменять временной паттерн импульсов нейронов в наружном бледном шаре (GPe) и внутреннем бледном шаре (GPi) (регулярный паттерн импульсов, синхронизированный стимулом), что блокирует передачу измененных паттернов нейрональной активности в базальные ганглии к их

целевым структурам в таламусе и стволе головного мозга, таким образом, смягчая симптомы брадикинезии и ригидности (Hashimoto et al., *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(5), 1916-1923: Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons). В настоящее время DBS одобрена для лечения нескольких двигательных нарушений (болезнь Паркинсона, дистония, эссенциальный тремор, эпилепсия) и психиатрических нарушений (обсессивно-компульсивное расстройство, депрессия).

Однако с DBS ассоциировано несколько недостатков, первым из которых является инвазивность способа и риски различных осложнений, таких как геморрагия, эпилептические припадки, инфекции, миграция электрода, поломка электрода и т.д. (Fenoy et al., *J Neurosurg*, 2014, 120, 132-139: Risks of common complications in DBS surgery: management and avoidance).

Другой проблемой является очаговость (т.е. пространственная разрешающая способность) сгенерированного электрического поля в мишени. Распространение электрического импульса также связано с побочными эффектами, такими как депрессия. Большое количество исследований было посвящено конструированию новых типов электродов, которые могут сдвигать и ограничивать стимул в определенной области (Luan et al., *Frontiers in Neuroengineering*, 2014, 7(27), 1-9: Neuro modulation: present and emerging methods). Проводится оценка других технологических аспектов: электроды (или провода), их размер, инвазивность устройства DBS, материал, составляющий провода, совместимость со способами визуализации (магнитно-резонансной), время жизни батарейки внутреннего генератора импульсов (IPG), ассоциированное с потребностью в непрерывной стимуляции.

Другие основные существующие типы электрической стимуляции, а именно, транскраниальная электрическая стимуляция или транскраниальная магнитная стимуляция, имеют преимущество, состоящее в том, что они не являются инвазивными, однако глубина проникновения электрического поля является малой. В связи с этим, их применения ограничиваются стимуляцией коры головного мозга (глубокие области головного мозга недостижимы). Более того, пространственная разрешающая способность остается плохой.

Электрическая стимуляция головного мозга остается актуальным способом лечения нейрональных нарушений. Однако существует потребность в более локализованной доставке электрического стимула и в увеличенной глубине проникновения без влияния на окружающие области головного мозга, чтобы избежать побочных эффектов, таких как психиатрические побочные эффекты, что в конечном итоге приведет к увеличению соотношения польза/риск лечения.

Недавно появились неинвазивные способы нейронной стимуляции, такие как использование света или ультразвука для прямой стимуляции нейронов. Тем не менее, недостатком этих способов является низкое пространственное разрешение.

Интересно, что проводились исследования наноматериалов с уникальными свойствами в качестве медиатора для конвертирования беспроводного первичного стимула в локализованный вторичный стимул, первичное электрическое поле или тепло, на поверхности контакта наноматериал-нейрон (Wang Y. & Guo L. *Frontiers in Neuroscience*. 2016; vol. 10, Article 69, Nanomaterial-enabled neural stimulation). Таким образом, была показана оптоэлектрическая трансдукция с использованием квантовых точек, оптотермическая трансдукция с использованием наноматериалов на основе золота, магнитоэлектрическая трансдукция с использованием магнитоэлектрических наночастиц, магнитотермическая трансдукция с использованием суперпарамагнитных наночастиц, и электроакустическая трансдукция с использованием пьезоэлектрических наноматериалов.

Большинство из этих появившихся способов с использованием наноматериалов требуют сопутствующей разработки источника энергии для обеспечения нейрональной стимуляции. Более того, поступающая энергии должна преобразовываться в эффективный вторичный стимул, который требует строго определенной структуры и композиции наночастицы, а также сохранения структуры и композиции наночастицы с течением времени.

Например, магнитоэлектрические (МЕ) наночастицы представляют собой комбинированные наночастицы, демонстрирующие пьезоэлектрические и магнитоэлектрические свойства. В частности, эффект МЕ, обеспечиваемый, например, наночастицами на основе $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-BaTiO}_3$, является результатом комбинированного действия двух различных материалов, т.е. магнитоэлектрического (CoFe_2O_4) материала и пьезоэлектрического (BaTiO_3) материала. Точнее, когда наночастицы $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-BaTiO}_3$ подвергаются воздействию магнитного поля: сначала магнитоэлектрический материал изменяет свою длину (объем), тем самым вызывая локальное напряжение, а затем пьезоэлектрический материал создает электрическую поляризацию (заряд) в качестве реакции на этот локальный стресс. Ни один из магнитоэлектрического материала или пьезоэлектрического материала не способен сам по себе индуцировать ни эффект МЕ, ни электрическую поляризацию под действием магнитного поля, как объяснено Grossinger R. et al. (Grossinger R. et al., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2008, 320, 1972-1977: The physics of magneto-electric composites).

Настоящее изобретение относится к наночастицам и/или агрегатам наночастиц (агрегатам из наночастиц) для применения для предупреждения или лечения/для применения в предупреждении или лечении неврологического заболевания (как правило, нарушения нейрональных сетей) или по меньшей мере одного его симптома, где наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию электрического

поля. Электрическое поле обычно применяют посредством глубокой стимуляции головного мозга (DBS), транскраниальной электрической стимуляции (TES) или транскраниальной магнитной стимуляции (TMS).

Наночастицы или агрегаты наночастиц нормализуют синхронизацию нейрональных колебаний (улучшают синхронию) и в/или между нейрональными сетями и в/или между различными областями головного мозга и повышают пространственное разрешение (очаговость) электрической стимуляции, вместе с тем используя стандартные способы электрической стимуляции. Таким образом, наночастицы или агрегаты наночастиц, описанные авторами изобретения помогают индивидууму/пациенту вернуться к здоровому состоянию.

Более того, наночастицы или агрегаты наночастиц по настоящему изобретению позволяют уменьшить применяемый ток, напряжение, длительность и/или частоту импульса и, таким образом, уменьшают известную потенциальную токсичность, связанную с применяемым/индуцируемым электрическим током.

Краткое описание

В настоящем описании впервые успешно описано применение наночастицы или агрегата наночастиц для предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, нуждающегося в этом, где наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию/возбуждают или активируют электрическим полем/стимулом. Материал наночастицы или агрегата наночастиц, как правило, выбран из проводникового материала, выбранного из металла, имеющего стандартный потенциал восстановления E° выше 0,2, который представляет собой Ir, Pd, Pt, Au или их смеси, и органического материала, имеющего смежные sp²-гибридизованные углеродные центры в его структуре, где данный органический материал состоит из полианилина, полипиррола, полиацетилена, политиофена, поликарбазола и/или полипирена; полупроводникового материала с E_g запрещенной зоны ниже 3,0 эВ, выбранного из элемента из группы IVA периодической таблицы Менделеева, который выбран из кремния (Si) и германия (Ge), смешанной композиции элементов группы III и V периодической таблицы Менделеева, смешанной композиции элементов из группы II и VI периодической таблицы Менделеева; изолирующего материала с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, который представляет собой смешанный оксид металла, выбранный из BaTiO₃, KTaNbO₃, KTaO₃, SrTiO₃ и BaSrTiO₃; и изолирующего материала с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже, который представляет собой диэлектрический материал, выбранный из оксида металла, смешанного оксида металла, металлического элемента из периода 3, 5 или 6 периодической таблицы Менделеева или лантанида, и углеродного материала, причем диэлектрическую постоянную ϵ_{ijk} определяют при температуре от 20°C до 30°C и при частоте от 10² Гц вплоть до инфракрасной частоты; и где электрическое поле применяют посредством глубокой стимуляции головного мозга, транскраниальной электрической стимуляции или транскраниальной магнитной стимуляции.

Подробное описание

Согласно оценкам, нервная система человека состоит из приблизительно 80-120 миллиардов нервных клеток (Herculano-Houzel S. *Frontier in Human Neuroscience* (2009), 3(31): 1-11, The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain). Определяющей характеристикой нейрона (или нервной клетки) является его способность передавать электрические сигналы в форме потенциалов действия.

Нейрон/нервная клетка составляет элементарный узел головного мозга. Нервные клетки могут обмениваться информацией друг с другом в высокоструктурированным образом, образуя нейрональные сети. Нейрон обменивается информацией через синаптические связи. В нейроне наноконтуры лежат в основе биохимического аппарата опосредования ключевых нейрональных свойств, таких как обучение и память, и генезиса нейрональной ритмичности.

Микроконтур может быть образован только несколькими взаимосоединенными нейронами, и он может выполнять сложные задачи, такие как опосредование рефлексов, обработка сенсорной информации, инициация передвижения и опосредование обучения и памяти. Макроконтур представляет собой более сложную сеть, которая состоит из множества входящих в него микроконтуров. Макроконтуры опосредуют высшие функции головного мозга, такие как распознавание объекта и познание. Таким образом, нервная система занята множеством уровней сетей.

Возбудимость нейрональной сети.

Нейроны посылают сообщения электрохимически (т.е. химические вещества/ионы вызывают электрический сигнал). Важными ионами в нервной системе являются натрий и калий, кальций и хлорид. Когда нейрон не передает сигнал, он находится в "покое". Когда нейрон находится в покое, внутреннее содержимое нейрона является отрицательным относительно наружного. Хотя концентрации различных ионов стремятся к равновесию по обеим сторонам мембраны, они не могут его достигнуть, поскольку клеточная мембрана позволяет только некоторым ионам проникнуть через каналы (ионные каналы). В дополнение к этим селективным ионным каналам, существует насос, который использует энергию для переноса трех ионов натрия из нейрона на каждые два иона калия, которые переносятся внутрь. Наконец,

когда эти силы уравниваются и проводится измерение разности потенциалов между внутренним содержимым и наружной средой нейрона, мембранный потенциал покоя (также "потенциал покоя") нейрона составляет приблизительно -70 мВ. Это означает, что внутри нейрона на 70 мВ меньше, чем снаружи. Наконец, существует относительно больше ионов натрия снаружи нейрона и больше ионов калия внутри этого нейрона. Потенциал действия (также определяемый как "пиковый потенциал" или "импульс") возникает, когда нейрон посылает информацию по аксону от тела клетки. Это означает, что некоторое событие (стимул) вызывает изменение потенциала покоя к 0 мВ. Когда деполяризация достигает приблизительно -55 мВ, нейрон генерирует потенциал действия. Если деполяризация не достигает этого критического порогового уровня, тогда потенциал действия не генерируется (механизм включения/выключения). Также, когда пороговый уровень достигается, всегда генерируется потенциал действия фиксированной амплитуды. Таким образом, либо деполяризация не достигает порогового уровня, либо генерируется полный потенциал действия.

Существует значительная вариабельность в скорости распространения потенциалов действия. В действительности, скорость распространения потенциалов действия в нервах может варьироваться от 100 м в секунду до менее чем одной десятой метра в секунду. В то время как временная постоянная является показателем того, насколько быстро мембрана будет отвечать на стимул во времени, пространственная постоянная (также постоянная длины) представляет собой показатель того, насколько хорошо электрический потенциал распространяется вдоль аксона в зависимости от расстояния.

Конфигурация связей в пределах и между нейрональными сетями.

Существует три типа сетей по конфигурации связей, которые используют для исследования обмена информацией в пределах и через головной мозг. Структурная конфигурация связей основана на обнаружение путей волокон, которые физически соединяют области головного мозга. Это представляет собой анатомические карты сетей, которые указывают на возможные пути, посредством которых сигналы могут перемещаться в головном мозге. Функциональная конфигурация связей идентифицирует активность в областях головного мозга, которые имеют сходную частоту, фазу и/или амплитуду сопоставляемой активности. Эффективная конфигурация связей использует информацию функциональной конфигурации связей и проходит на один шаг дальше и определяют прямое или не прямое влияние, которое одна нервная система может оказывать на другую, более конкретно, направление динамического информационного потока в головном мозге (Bowyer et al., *Neuropsychiatric Electrophysiology*, 2016, 2(1), 1-12: Coherence a measure of the brain networks: past and present).

Детекцию синхронизированной активности в нейрональной сети можно проводить посредством магнитоэнцефалографии (MEG), электроэнцефалографии (EEG), функциональной магнитно-резонансной томографии (fMRI) или позитронно-эмиссионной томографии (PET), а затем визуализировать с использованием анализа конфигурации связей в сети. MEG (магнитоэнцефалография) или EEG (электроэнцефалография) являются предпочтительными, поскольку они имеют высокое временное разрешение для разрешения динамического потока информации. Анализ конфигурации связей головного мозга проводят для картирования сетей обмена информацией, требуемых для функционирования головного мозга. Конкретные области в головном мозге являются специализированными для переработки определенных типов информации. Способы визуализации показали, что эти области соединены и обмениваются информацией с другими специализированными областями среди сетей в головном мозге. "Когеренция" (Bowyer et al., *Neuropsychiatric Electrophysiology*, 2016, 2(1), 1-12: Coherence a measure of the brain networks: past and present.) представляет собой математический способ, который количественно определяет частоту и амплитуду синхронности (состояние синхронии или наличие синхронизации) нейрональных паттернов осциллирующей активности головного мозга. Обнаружение синхронной активации нейронов можно использовать для определения благополучия или целостности функциональной конфигурации связей головного мозга человека. Наложение карт функциональной конфигурации связей на изображения структурной конфигурации связей и использование направления информационного потока, исходящего в результате эффективной конфигурации связей, обеспечивает полное понимание того, как функционирует головной мозг. Эти способы позволяют оценить терапию на основе визуализации конфигурации связей до и после лечения.

Интактный головной мозг проявляет комплексные паттерны синхронной активности, ассоциированные с различными "состояниями" организма, от медленного дельта-ритма (0,5-4°C), до тета (4-8 Гц), альфа (8-12 Гц), бета (15-30 Гц) и гамма (30-70 Гц) колебаний. Интересно, что диссоциированная культура кортикальных структур обеспечивает удобную систему для исследования правил, которые контролируют возникновение, образование и распространение разряда (пиковый потенциал) и пачки (кластеры пиковых потенциалов) в сетях из популяций плотно взаимосвязанных нейронов. Активность сетей можно регистрировать в течение длительных периодов времени неинвазивным образом и с точным временным разрешением с использованием мультиэлектродных матриц. 2-мерную диссоциированную культуру можно использовать в качестве эффективной тест-системы для исследования правил, которые контролируют образование и поддержание активности сетей в головном мозге, позволяя тестировать гипотезу, которая не может быть изучена в интактном головном мозге (Cohen E. et al., *Brain Research*, 2008, 1235, 21-30: Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus).

В настоящем описании впервые успешно описано применение наночастицы или агрегата наночастиц для предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, нуждающегося в этом, когда наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию электрического поля. Материал наночастицы или агрегата наночастиц, как правило, представляет собой материал, выбранный из проводникового материала, полупроводникового материала, изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже.

Термин "лечение" относится к терапевтическому лечению или мерам, способным предупреждать, смягчать или излечивать заболевание, нарушение или дисфункциональное состояние, как описано в настоящем описании. Такое лечение предназначено для млекопитающего, предпочтительно человека, нуждающегося в этом. По существу предусматриваются индивидуумы, у которых уже идентифицировано (диагностировано) заболевание, нарушение или дисфункциональное состояние, как описано в настоящем описании, или индивидуумы, считающиеся имеющими "риск развития" такого заболевания, нарушения или дисфункционального состояния, для которых лечение является превентивным или профилактическим лечением.

Аномальное модулирование колебательного сообщения между нейронами действительно существует при различных типах неврологических заболеваний или нарушений (также идентифицированных в настоящем описании как "нервные заболевания или нарушения") (Uhlhaas et al., *Neuron*, 2006, 52, 155-168: Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology; Basar E. et al., *International Journal of Psychophysiology* 103 (2016) 135-148, What does the broken brain say to the neuroscientist? Oscillations and connectivity in schizophrenia, Alzheimer's disease, and bipolar disorder).

Нервную систему человека подразделяют на центральную нервную систему (ЦНС) и периферическую нервную систему (ПНС). ЦНС в свою очередь подразделяют на головной мозг и спинной мозг, которые расположены во внутримозговой полости черепа и позвоночном канале, соответственно. ЦНС и ПНС, действуя согласованно, интегрируют сенсорную информацию и контролируют двигательную и когнитивную функции. На фиг. 1 представлено упрощенное изображение структуры головного мозга.

Синхрония (или синхронизация) в и/или между нейрональными сетями, в и/или между различными областями головного мозга осуществляется посредством координации нейрональных колебаний во времени (Buzsaki et al., *Science*, 2004, 304, 1926-1929: Neuronal oscillations in cortical networks). Двигательные нарушения обычно являются следствием гиперсинхронии, что означает, что синхронизация колебаний в и/или между нейрональными сетями в и/или между различными областями головного мозга является слишком высокой и/или слишком длительной. Психиатрические и когнитивные расстройства обычно являются следствием ухудшения синхронии, что означает, что синхронизация колебаний в и/или между нейрональными сетями в и/или между различными областями головного мозга является сниженной (как правило, демонстрирует сниженную активность) или даже исчезает (см. табл. 1: Аномальная нейрональная синхрония при неврологических нарушениях (по материалам Uhlhaas et al., *Neuron*, 2006, 52, 155-168: Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology).

Таблица 1

Тип симптомов	Неврологическое расстройство	Нейрональная синхрония
Двигательные	Болезнь Паркинсона	высокая
	Эпилепсия	
	Дистония	
Психиатрические	Шизофрения	ухудшенная
	Аутизм	
Когнитивные	Болезнь Альцгеймера	

Поскольку "когеренция" представляет собой математический способ, который количественно определяет частоту и амплитуду синхронности (состояния синхронии или наличия синхронизации) нейрональных паттернов осциллирующей активности головного мозга, можно полагать, что слишком высокая и слишком низкая когеренция вовлечены в двигательные расстройства и психиатрические/когнитивные расстройства, соответственно (Bowyer et al., *Neuropsychiatric Electrophysiology*, 2016, 2(1), 1-12: Coherence a measure of the brain networks: past and present) (см. фиг. 2).

В конкретном аспекте неврологическое заболевание или нарушение, на которое осуществляется нацеливание в контексте изобретения, выбрано из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, эпилепсии, обсессивно-компульсивного расстройства, расстройства аутистического спектра, депрессивного расстройства, дистонии, синдрома Туретта, шизофрении, инсульта, афазии, деменции, тиннитуса, болезни Гентингтона, эссенциального тремора, биполярного расстройства, тревожного расстройства, обусловленного зависимостью нарушения, вегетативного состояния сознания, например, выбранного из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, эпилепсии, обсессивно-компульсивного расстройства, расстройства аутистического спектра, депрессивного расстройства, дистонии, синдрома Туретта, шизофрении, инсуль-

та, афазии, деменции, тиннитуса, болезни Гентингтона, эссенциального тремора, биполярного расстройства, тревожного расстройства, обусловленного зависимостью нарушения, вегетативного состояния сознания и по меньшей мере одного их симптома.

Как уже пояснено в настоящем описании выше, неврологические заболевания или расстройства могут быть классифицированы в зависимости от первичных симптомов, которыми страдают пациенты, которые представляют собой двигательные нарушения, психиатрические расстройства (настроения/социальные) и когнитивные расстройства, как дополнительно подробно описано ниже.

Пример двигательных нарушений.

Болезнь Паркинсона.

Болезнь Паркинсона (PD) страдает приблизительно от 7 до 10 миллионов человек во всем мире, и она характеризуется тремором, дискинезией, брадикинезией, феноменом замерзания походки и т.д. PD представляет собой медленно прогрессирующее дегенеративное заболевание головного мозга. Оно поражает нервные клетки в областях головного мозга, называемых базальными ганглиями и черной субстанцией. Нервные клетки в черной субстанции продуцируют дофамин - нейротрансмиттер, который выступает в качестве химического мессенджера в контуре головного мозга, важном для планирования и контроля движений тела. При PD продуцирующие дофамин нервные клетки черной субстанции погибают преждевременно у некоторых индивидуумов (Corti et al., *Physiol Rev*, 2011, 91, 1161-1218: What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease). Когда рецепторы дофамина в полосатом теле стимулируются неадекватно, части базальных ганглиев либо недостаточно стимулируются, либо избыточно стимулируются. В частности, субталамическое ядро (STN) становится гиперактивным и выступает в качестве ускорителя для внутреннего бледного шара (GPi). Сверхстимуляция GPi оказывает сверхингибиторный эффект на таламус, который в свою очередь снижает свою продуктивность и вызывает замедление движений и ригидность (Guo et al., *Frontiers in Computational Neuroscience*, 2013, 7, 124, 1-11: Basal ganglia modulation of thalamocortical relay in Parkinson's disease and dystonia).

Недостаток дофамина при PD связан с чрезмерной осцилляционной синхронизацией бета-чистоты по всей двигательной сети кортикальных базальных ганглиев. Действительно, прогнозируется, что уровни дофамина в базальных ганглиях подавляют бета-синхронию, что в свою очередь опосредует дофаминергическое вовлечение, необходимое для предвосхищения движений (Jenkinson et al., *Trends in Neuroscience*, 2011, 34 (12), 611-618: New insights into the relationship between dopamine, beta oscillations and motor function). Если уровень дофамина в базальных ганглиях не является достаточно высоким, тогда отсутствует контроль синхронии бета-колебаний и может возникнуть замедленность движений. Другое наблюдение у пациентов с болезнью Паркинсона ведет к заключению, что кортикальные колебания в бета-полосе обеспечивают и поддерживают эти колебания в базальных ганглиях (Lalo et al., *The Journal of Neuroscience*, 2008, 28 (12), 3008-3016: Patterns of bidirectional communication between cortex and basal ganglia during movement in patients with Parkinson disease).

Для лечения симптомов тремора и ригидности можно использовать глубокую стимуляцию головного мозга (DBS) (Eusebio et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, 82, 569-573: Deep brain stimulation can suppress pathological synchronization in parkinsonian patients). Лечение симптомов PD посредством DBS одобрено FDA с 2002 года (лечение эссенциального тремора с 1997 года). Наиболее часто используемыми параметрами стимуляции, пригодными в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами, являются: частота от 130 до 185 Гц, длительность импульса от 60 до 210 мс и амплитуда напряжения от 1 до 3,5 В (Kuncel et al., *Clinical Neurophysiology*, 2004, 115, 2431-2441: Selection of stimulus parameters for DBS). Электрическую стимуляцию обычно проводят в базальных ганглиях, в STN и в GPi. Как упоминалось выше, кортикальные бета-колебания также вовлечены в патофизиологию заболевания, так что также для лечения симптомов болезни Паркинсона можно использовать транскраниальную стимуляцию (такую как транскраниальная магнитная стимуляция - TMS) коры (Cantello et al., *Brain Research Reviews*, 2002, 38, 309-327: Transcranial magnetic stimulation and Parkinson's disease).

Дистония.

Дистония представляет собой неврологическое расстройство, характеризующееся аномальными непроизвольными крутящими и поворачивающими движениями, которые отражают нарушение функции двигательной системы. Существует несколько типов дистонии, в зависимости от части тела, пораженной симптомами, от их генетического источника, от типа вовлеченного нейротрансмиттера и т.д. Центральная нервная система (ЦНС) при дистонии демонстрирует дефектное ингибирование, которое провоцирует утрату реципрокного спинального ингибирования между мышцами-антагонистами. В случае верхней дистонии, например, аномальная синхронизация нейронов/нервов, обеспечивающая входной сигнал для мышц-антагонистов предплечья, приводит к совместному сокращению этих мышц-антагонистов (симптом дистонии) (Farmer et al., *Brain*, 1998, 121, 801-814: Abnormal motor unit synchronization of antagonist muscles underlies pathological co-contraction in upper limb dystonia).

Мишенью DBS, демонстрирующей интересный антидистонический эффект, является внутренний бледный шар (GPi-DBS). GPi-DBS одобрена FDA в 2003 году для пациентов с хронической не поддающейся медикаментозному лечению дистонией (Ni et al., *Translational Neurodegeneration*, 2014, 3(2), 1-5:

Deep brain stimulation for dystonia). Стимуляция вентрального промежуточного (VIM) ядра таламуса (VIM-DBS) дает значительно менее устойчивые эффекты. В качестве эксперимента проводилась стимуляция с использованием субталамического ядра (STN-DBS). GPi-DBS обеспечивает облегчение основных симптомов дистонии, однако полное развитие терапевтических эффектов отнимает от нескольких недель до месяцев (Dressier et al., J Neural Transm, 2015, DOI 10,1007/s00702-015-1453-x: Strategies for treatment of dystonia). Наиболее часто используемыми стимулирующими параметрами, пригодными в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами, являются: частота 130-180 Гц; длительность импульса 60-210 мс; амплитуда 2-5 Вольт.

Эпилепсия.

Эпилепсия представляет собой нарушение головного мозга, которым страдает приблизительно 50 миллионов человек по всему миру и которое характеризуется преимущественно рецидивирующими и непредсказуемыми прерываниями нормальной функции мозга, называемыми эпилептическими припадками. Эпилепсия не является одной нозологической формой, а скорее представляет собой совокупность разнообразных нарушений, отражающих лежащую в их основе дисфункцию головного мозга, которая может быть результатом множества различных причин (генетическая мутация, опухоли головного мозга, травма головы, инсульты, алкоголизм, воспаление головного мозга, инфекции, такие как менингит, ВИЧ или вирусный энцефалит и т.д.) (Fisher et al., Neurology, 2015, 28(2), 130-135: Redefining epilepsy).

Эпилептический припадок определяют как временное появление признаков и/или симптомов в результате чрезмерной синхронной нейрональной активности в головном мозге (Fisher et al., Epilepsia, 2005, 46(4), 470-472: Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)). Кора головного мозга является основным элементом генерирования эпилептических припадков: у многих людей диагностируются очаговые припадки лобных долей или средних височных долей (National Institute of Neurological Disorders and Stroke: http://www.ninds.nih.gov/disorders/epilepsy/detail_epilepsy.htm#3109_7). Идентификация областей повышенной локальной синхронии, или "гиперсинхронии", в коре указывает на то, что локальная гиперсинхрония может быть маркером генерирующих припадков областей (Schevon et al., Neuroimage, 2007, 35(1), 140-148: Cortical abnormalities in epilepsy revealed by local EEG synchrony).

Нейростимуляция для лечения эпилепсии может иметь форму стимуляции периферических нервов, такой как стимуляция блуждающего нерва (VNS); стимуляции спинного мозга; транскраниальной стимуляции головного мозга (TES или TMS); или глубокой стимуляции головного мозга (DBS). Другой стратегией является адаптивная нейростимуляция, где стимуляция происходит, только когда обнаруживается начало припадка. В 2004 году было опубликовано исследование для проверки и подтверждения принципа адаптивной нейростимуляции у трех пациентов с эпилепсией, в котором двух пациентов лечили посредством кортикальных сетчатых или ленточных электродов, и одного посредством гиппокампальных глубинных электродов. Индивидуальные припадки могли укорачиваться при начале стимуляции, и общая частота припадков снижалась на 50-75% (Kossoff et al., Epilepsia, 2004, 45, 1560-1567: Effect of an external responsive neurostimulator on seizures and electromagnetic discharges during subdural electrode monitoring). Как VNS, так и адаптивная нейростимуляция были одобрены FDA для лечения определенных типов эпилепсии в США. DBS переднего ядра таламуса (ANT) была одобрена в странах Евросоюза (Fisher et al., Nature Reviews Neurology, 2014, 10, 261-270: Electrical brain stimulation for epilepsy). Было проведено многоцентровое рандомизированное контролируемое испытание билатеральной стимуляции переднего ядра таламуса при эпилепсии (SANTE) на 110 взрослых пациентах, которые имели парциальные припадки со вторичной генерализацией или без нее по меньшей мере шесть раз в месяц, но не более 10 раз в сутки. Исходная частота припадков регистрировалась в течение 3 месяцев, после чего следовала имплантация электрода DBS, восстановление в течение 1 месяца, а затем период слепого исследования в течение 3 месяцев либо активной стимуляции, либо отсутствия стимуляции (плацебо). Параметры стимуляции представляли собой 1 мин импульсов длительностью 90 мс при 5 В с частотой 145 Гц, а затем 5 мин без стимуляции. Частота припадков снижалась от исходного уровня в среднем на 20% в ходе периода восстановления, длившегося 1 месяц. Затем частота припадков в двух группах лечения значительно расходилась со средним улучшением 40,4% в активной группе и 14,5% в группе плацебо. В активной группе происходило значительно меньше комплексных парциальных припадков и значительно меньше припадков типа, который проспективно определялись пациентами как "наиболее тяжелые" (Fisher et al., Epilepsia, 2010, 51, 899-908: Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy). Описанные здесь условия электрической стимуляции/лечения могут быть использованы в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами.

Примеры психиатрических расстройств (расстройств настроения/социальных расстройств).

Обсессивно-компульсивные расстройства (OCD).

Обсессивно-компульсивные расстройства (OCD) представляет собой распространенное психиатрическое расстройство, которое часто является хроническим, тяжелым и чрезвычайно истощающим. Обычно оно также рефрактерно к лечению, и значительная часть пациентов не отвечают или достигают только частичного облегчения.

Функциональные исследования по нейровизуализации продемонстрировали дисфункцию орбитоф-

ронтальной коры, базальных ганглиев и полосатого тела.

Исследование показало, что острые симптомы OCD могут быть связаны с аномальной высокой осцилляторной активностью в субталамическом ядре (STN), в частности, в левом полушарии и в диапазоне частот дельта-альфа (1-12 Гц) (Bastin et al., *Cortex*, 2014, 60, 145-150: Changes of oscillatory activity in the subthalamic nucleus during obsessive-compulsive disorder symptoms: two case reports). Более того, некоторые субталамические нейроны специфически увеличивали их частоту импульсов, когда возникали сомнения в ходе верификационных заданий (Burbaud et al., *brain*, 2013, 136(1), 304-317: Neuronal activity correlated with checking behavior in the subthalamic nucleus of patients with obsessive-compulsive disorder).

DBS вентральной передней ножки внутренней капсулы (VC) и соседнего вентрального стриатума (VS) была одобрена в EU для лечения тяжелого и в высокой степени резистентного к лечению OCD (VC/VS-DBS). Чтобы продемонстрировать терапевтическую перспективность процедуры, четыре клинических центра проводили совместную работу очень тщательно в небольших исследованиях на протяжении 8 лет, и анализировали их данные (Greenberg et al., *Molecular Psychiatry*, 2010, 15, 64-79: Deep brain stimulation of the ventral internal capsule/ventral striatum for obsessive-compulsive disorder: worldwide experience). Электроды DBS имплантировали билатерально для стимуляции дорсально-вентральной области передней капсулы. Частота электрического стимула составляла 100-130 Гц, длительность импульса находилась в диапазоне от 90 до максимум 450 мс. Интенсивность DBS обычно находилась в диапазоне от 2 до 8 В, что приводило к току в диапазоне приблизительно от 2 до 15 мА в зависимости от сопротивления электрода (как правило, 500-1000 Ом). В заключение этих объединенных данных, клинически значимое уменьшение симптомов и функциональное улучшение наблюдали у приблизительно двух третей в высокой степени резистентных к лечению пациентов (всего 26 пациентов), что указывает на обнадеживающие терапевтические эффекты после VC/VS-DBS. Описанные здесь условия электрической стимуляции/лечения можно использовать в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами.

Расстройства аутистического спектра.

Аутизм представляет собой связанный с неврологическим развитием симптом, который определяется дефицитом социального взаимодействия и коммуникации, и необычно ограниченным повторяющимся поведением. Аутизм представляет собой расстройство, которое обычно начинается в младенческом возрасте, самое позднее в первые три года жизни. Аутизм представляет собой гетерогенное состояние (нет двух детей или взрослых с аутизмом, имеющих сходный профиль), что привело к концепции "расстройства аутистического спектра", классифицирующей несколько уровней заболевания в соответствии со степенью дефицита речи или общей задержкой когнитивного процесса, и в соответствии с тяжестью социальных или поведенческих симптомов (Lord et al., *Neuron*, 2000, 28, 355-363: Autism spectrum disorders). С одной стороны этого спектра индивидуумы с аутизмом являются в высокой степени работоспособными, что позволяет им жить самостоятельно и иметь работу. Индивидуумы, характеризующиеся как имеющие низкую работоспособность, имеют более тяжелые симптомы: затрудненность речи (или даже невербальный язык), плохая социальная коммуникация, самотравмирующее поведение (SIB), вспышки раздражения и агрессия, которые потенциально могут быть угрожающими жизни. Важной тенденцией структурных и функциональных исследований головного мозга при аутизме является вовлечение сети социоэмоциональной обработки информации: лимбической системы, лицевой обрабатывающей системы и сети зеркальных нейронов. Было показано, что дефицит синхронизации колебаний гамма-полосы вовлечен в появление симптомов (Sinha et al., *Neurosurgery Focus*, 2015, 38(6), E3: Deep brain stimulation for severe autism: from pathophysiology to procedure).

Две основных группы симптомов, которые могут требовать лечения при тяжелом аутизме, представляют собой социальные дефициты, в том числе невербальная коммуникация и отсутствие способности отвечать на речь, и SIB, которое является угрожающим жизни. По-видимому, в патофизиологии этих нарушений участвует миндалевидная железа. В нарушение патофизиологии при аутизме вовлечен измененный возбуждающий или ингибиторный контроль. Нейромодулирование миндалевидных желез, являющихся мишенями, посредством DBS может представлять собой терапевтическое вмешательство для пациентов с тяжелым аутизмом. В литературе описано три случая лечения DBS. Целью лечения в основном было смягчение двигательных нарушений, таких как стеротипы (повторяющийся паттерн движений) и самотравмирующее поведение (SIB), ассоциированных с заболеванием (Sinha et al., *Neurosurgery Focus*, 2015, 38(6), E3: Deep brain stimulation for severe autism: from pathophysiology to procedure; Stocco et al., *Parkinsonism and related disorders*, 2014, 20, 1035-1036: Deep brain stimulation for severe secondary stereotypies). Параметрами DBS, которые можно использовать в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами, являются: частота от 80 до 130 Гц, длительность импульса от 120 до 210 мс и амплитуда напряжения от 2,5 до 6,5 В (Sinha et al., *Neurosurgery Focus*, 2015, 38(6), E3: Deep brain stimulation for severe autism: from pathophysiology to procedure). Было описано, что в одном из трех случаев DBS в базолатеральном ядре приводила к значительному улучшению связанных с аутизмом симптомов, таких как социальный контакт, модулирование эмоциональной реакции и ночной сон (Sturm et al., *Frontiers in Human Neuroscience*, 2013, 6, 341, 1-10).

Шизофрения.

Шизофрения представляет собой хроническое психиатрическое заболевание, характеризующееся, среди прочего, следующими симптомами: позитивные симптомы, которые отражают aberrантную психическую активность (галлюцинации и бред); негативные симптомы, которые соответствуют дефициту психической функции, которая обычно присутствует (нарушение мышления, притупление эмоциональной реакции, бедность речи). Что касается причин нетрудоспособности на протяжении жизни шизофрения находится в верхней десятке.

Выраженное увеличение желудочков и увеличение количества цереброспинальной жидкости на поверхности головного мозга указывают на то, что головной мозг атрофируется. Эта потеря серого вещества и уменьшенное количество синаптических структур на нейронах указывают на то, что шизофрения представляет собой связанное с неврологическим развитием расстройство, что означает, что аномалии в головном мозге уже присутствуют у пациентов при первом эпизоде (в противоположность нейродегенеративному нарушению).

Было показано, что у пациентов с шизофренией наблюдаемое ухудшение нейрональных контуров является следствием недостаточности синхронизации гамма-полос (Spencer et al., *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(19), 7407-7411: Abnormal neural synchrony in schizophrenia; Gallinat et al., *Clinical Neurophysiology*, 2004, 115, 1863-1874: Reduced oscillatory gamma-band responses in unmedicated schizophrenic patients indicate impaired frontal network processing).

Было продемонстрировано, что электросудорожная терапия (ECT), т.е. шоковое лечение, является одним из наиболее успешных нефармакологических способов лечения при шизофрении (Payne et al., *J. Psychiatr. Pract.*, 2009, 15(5), 346-368: Electroconvulsive therapy part I: a perspective on the evolution and current practice of ECT) и является пригодной в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами. Она вовлекает последовательное применение электрического тока к головному мозгу, который вызывает припадки, сравнимые с эпилептическими.

Электрическая стимуляция для симптоматического лечения также возможна в ходе DBS. Например, DBS (частота 145 Гц, длительность импульса 90 мс, амплитуда напряжения 4 В) прилежащего ядра (NAcc) при депрессии ведет к ремиссии ангедонии, т.е. восстановлению гедонического удовольствия (Schlaepfer et al., *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33, 368-377: Deep brain stimulation to reward circuitry alleviates anhedonia in refractory major depression) и является пригодной в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами.

Пример когнитивного расстройства.

Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой нейродегенеративное нарушение, и оно ведет к прогрессирующей утрате психической, поведенческой, функциональной функции и снижению способности к обучению. Приблизительно 200000 человек в возрасте менее 65 лет с AD составляют популяцию с AD с началом в более молодом возрасте; 5 миллионов человек имеют возраст 65 лет или старше.

Последние данные указывают на то, что когнитивные дефициты, наблюдаемые при болезни Альцгеймера, ассоциированы с функциональным размыканием нейро-когнитивных сетей. Анализ общей синхронизации ЭЭГ демонстрирует широко распространенное уменьшение синхронизации альфа-, бета- и гамма-полос, сопровождающееся увеличением синхронизации дельта-полос. Показано, что у пациентов с мягкой болезнью Альцгеймера, снижение синхронизации коррелирует с когнитивным нарушением Schnitzler et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6, 285-296: Normal and pathological oscillatory communication in the brain). Продолжаются клинические испытания для оценки потенциала DBS для лечения болезни Альцгеймера. Параметры стимуляции, обычно используемые в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами, представляют собой: частота 130 Гц, длительность импульса 60 или 90 мс, амплитуда напряжения от 3 до 5 В (Laxton et al., *World Neurosurgery*, 2013, 80, S28.E1-S28.E8: Deep brain stimulation for the treatment of Alzheimer disease and dementias).

Электрическая стимуляция.

В контексте изобретения электрическое поле предпочтительно применяют посредством глубокой стимуляции головного мозга, транскраниальной электрической стимуляции или транскраниальной магнитной стимуляции. Также в контексте изобретения можно применять стимуляцию блуждающего нерва (VNS) и стимуляцию спинного мозга, например, в контексте эпилепсии. В контексте изобретения можно использовать любой другой известный способ электрической стимуляции, такой как способ, описанный в Grossman N. et al. (*Cell*, 2017, 169, 1029-1041: Noninvasive deep brain stimulation via temporally interfering electric fields), который представляет собой неинвазивную глубокую стимуляцию головного мозга, проводимую посредством временно интерферирующих электрических полей.

В контексте изобретения двумя основными областями головного мозга для электрической стимуляции являются глубокие области головного мозга и кора головного мозга.

Электрическая стимуляция может достигать глубоких областей головного мозга благодаря хирургической имплантации электрода [глубина проникновения электродов под поверхность кожи равна или превышает 10 см и диапазон проникновения электрического поля, генерируемого электродами, составляет несколько миллиметров: глубокая стимуляция головного мозга (DBS)].

Когда необходимо достигнуть коры головного мозга, электрическую стимуляцию проводят на поверхности (глубина проникновения электрического поля обычно составляет 2 см или ниже под поверхность кожи; с помощью специальной технологии -специализированных спиралей для транскраниальной магнитной стимуляции - электрическое поле может достигнуть глубины 5 см). Способы, обеспечивающие такое электрическое поле, в основном, включают транскраниальную магнитную стимуляцию (TMS), повторяющуюся транскраниальную магнитную стимуляцию (rTMS), транскраниальную стимуляцию постоянным током (tDCS), транскраниальную стимуляцию постоянным током с высокой разрешающей способностью (HD-tDCS), транскраниальную электрическую стимуляцию (TES), транскраниальную стимуляцию переменным током (tACS), транскраниальную стимуляцию импульсным током (tPCS) и транскраниальную стимуляцию случайными шумами (tRNS; переменный ток случайной амплитуды и частоты). Наиболее широко используемыми в клинических испытаниях и предпочтительными в контексте изобретения являются TMS и tDCS.

Глубокая стимуляция головного мозга.

Устройство DBS включает три ключевых компонента: стимулирующей электрод (также называемый выводом), удлинительный кабель и программируемый генератор импульсов (PG), который напоминает кардиостимулятор. Устройство имплантируется в ходе двух стадий. На первой стадии односторонний или двухсторонние электрод(ы) имплантируют стереотаксическим образом в конкретную мишень терапии в глубоких областях головного мозга. На второй стадии, которая может быть проведена в тот же день или позднее, имплантируют генератор(ы) импульсов под кожу передней стенки грудной полости (ниже ключицы) или в живот, и соединяют с проводом(ами) вывода через подкожно туннелированные удлинительные кабели. Вывод обычно имеет длину 40 см и диаметр 1,27 мм и он представляет собой множество контактных электродов (в большинстве случаев 4 контактных электрода на вывод - т.е. четырехполюсный электрод) шириной 1,5 мм или 3 мм в зависимости от показания на расстоянии от 0,5 до 4 мм на выводе. Можно стимулировать один или два контактных электрода (когда используют два электрода, один представляет собой анод, а другой представляет собой катод). Через контактные электроды прямо осуществляется электрическая стимуляция в глубоких областях головного мозга, точнее в базальных ганглиях. Обычный электрический ток, пригодный для применения в контексте изобретения, является импульсным с высокой частотой [от 100 до 200 Гц, наиболее часто используется 130 Гц], длительность импульса от 60 до 120 мс, низким напряжением (ниже 4 В) и низким током (ниже 2 мА)].

Применение высокочастотной электрической стимуляции к базальным ганглиям в основном является одобренным (по меньшей мере в США и/или в Евросоюзе) и может быть использовано в контексте изобретения для нескольких двигательных/моторных нарушений, таких как болезнь Паркинсона, дистония, эпилепсия, обсессивно-компульсивные расстройства (OCD) и синдром Туретта.

Транскраниальная магнитная стимуляция (TMS).

Транскраниальная магнитная стимуляция (TMS) представляет собой неинвазивный способ, который используется или исследуется для многочисленных научных и терапевтических применений, включая исследование нормальных и патологических функций головного мозга и лечение нервных расстройств, и который может использоваться в контексте изобретения. В TMS используются кратковременные интенсивные импульсы электрического тока, подаваемые на спираль, помещенную в голову индивидуума, для генерирования электрического поля в головном мозге посредством электромагнитной индукции. Индуцированное электрическое поле модулирует трансмембранные потенциалы нейронов и, тем самым, активность нейронов. Очаг активации в головном мозге приблизительно находится в области, где индуцированное электрическое поле является максимальным; эта область в свою очередь зависит от геометрии и локализации стимулирующей спирали. Двумя пространственными характеристиками электрического поля являются глубина проникновения и очаговость, обе из которых зависят от геометрии спирали и легко определяются специалистом в данной области. Повторяющуюся TMS (rTMS) обычно используют при депрессии, боли, инсульте и т.д.

Транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) Транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) является неинвазивным способом, который может использоваться в контексте изобретения, где стимуляцию головного мозга осуществляют благодаря постоянному току, что ведет к изменениям возбудимости коры. В tDCS используется низкоинтенсивный (0,5-2 мА) постоянный ток, который подается непосредственно на голову посредством двух электродов (анод/катод) размером обычно 20-35 см². Один электрод (эталонный электрод) может быть помещен на лоб (выше надбровной дуги), а другой (активный электрод) может быть помещен на противоположное полушарие, обычно над двигательной корой (M1) или дорсолатеральной префронтальной корой в зависимости от конструкции. Длительность стимуляции наиболее часто находится в диапазоне от 20 до 40 мин. Часть тока проникает в головной мозг, вызывая пиковое электрическое поле приблизительно 0,3 В/м на примененный 1 мА. Постоянное электрическое поле, возникающее в ходе tDCS, модифицирует трансмембранный нейрональный потенциал и может влиять на уровень возбудимости и способность отвечать на синаптический вход, и модулирует скорость разряда индивидуальных нейронов. При анодной стимуляции возникает повышенная возбудимость, в то время как при катодной стимуляции обычно возникает сниженная возбудимость.

tDCS может использоваться для лечения аутизма (Chi et al., Medical Hypotheses, 2014, 83, 614-618:

Treating autism by targeting the temporal lobes), для двигательной реабилитации после инсульта (Gillick et al., *Frontiers in Human Neuroscience*, 2014, 8(739), 1-9: Pediatric stroke and tDCS: method for rational individualized dose optimization), большого депрессивного расстройства (Croarkin et al., *Frontiers in Human Neuroscience*, 2014, 8 (669), 1-9: Developmental aspects of cortical excitability and inhibition in depressed and healthy youth: an exploratory study).

Наночастицы.

В настоящем описании описана наночастица или агрегат наночастиц для применения в соответствии с изобретением для предупреждения или лечения/для применения в предупреждении или лечении неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, когда указанную наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию электрического поля, где материал наночастицы или агрегата наночастиц обычно выбран из проводникового материала, полупроводникового материала, изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже.

Композиция наночастиц.

Наночастица, изготовленная из проводникового материала.

Наночастица, изготовленная из проводникового материала, представляет собой органическую наночастицу или неорганическую наночастицу.

Неорганическую наночастицу, изготовленную из проводникового материала, обычно изготавливают с металлическим элементом, имеющим стандартную величину потенциала восстановления E° , составляющую приблизительно 0,01 выше, как правило, при определении при 25°C и под давлением 1 атм относительно стандартного водородного электрода (см. таблицу 2 "reduction reactions having E° values more positive than that of the standard hydrogen electrode", 8-25, *Handbook of chemistry and physics*; David R. Lide; 88th Edition), более предпочтительно, составляющую приблизительно 0,1, 0,2, 0,4 или 0,5 выше. Типичные металлические элементы, используемые для изготовления наночастиц, могут быть выбраны из Tl, Po, Ag, Pd, Ir, Pt, Au и их смеси. Предпочтительно, металлический элемент, пригодный в качестве проводникового материала для изготовления наночастиц по настоящему изобретению, выбран из Ir, Pd, Pt, Au и их смеси.

Органическую наночастицу, изготовленную из проводникового материала, обычно изготавливают с органическим материалом, имеющим непрерывные sp^2 -гибридизованные углеродные центры в его структуре (т.е. углеродную двойную связь или ароматические циклы, содержащие гетероатомы, как правило, N или S, в ароматическом цикле или снаружи ароматического цикла). Предпочтительные органические материалы выбраны из полианилина, полипиррола, полиацетилена, политиофена, поликарбазола, полипирена, поли(3,4-этилендиокситиофена) и/или поли(3,4-этилендиокситиофен)полистиролсульфоната.

Наночастицы, изготовленные из полупроводникового материала.

Наночастица, изготовленная из полупроводникового материала, обычно представляет собой неорганическую наночастицу.

Неорганические наночастицы, обычно изготовленные из полупроводникового материала, демонстрируют относительно небольшую энергию (E_g) запрещенной зоны между ее валентностью и полосой проводимости. Как правило, полупроводниковый материал имеет E_g запрещенной зоны ниже 3,0 эВ, обычно при измерении при комнатной температуре (25°C). В конкретном аспекте материал представляет собой собственный полупроводниковый материал или несобственный полупроводниковый материал, как дополнительно описано в настоящем описании ниже.

Собственные полупроводниковые материалы обычно состоят из элемента группы IV A периодической таблицы Менделеева, такого как кремний (Si) или германий (Ge), в смешанной композиции элементов групп III и V периодической таблицы Менделеева, такой как AlSb, AlN, GaP, GaN, InP, InN и т.д., или в смешанной композиции элементов групп II и VI периодической таблицы Менделеева, такой как ZnSe, ZnTe, CdTe и т.д.

Несобственные полупроводниковые материалы обычно содержат или состоят из внутреннего полупроводника, изготовленного с высокой степенью чистоты, где собственный полупроводниковый материал содержит примесь. В конкретном аспекте, когда несобственный полупроводниковый материал наночастицы или агрегата наночастиц состоит из элемента группы IVA периодической таблицы Менделеева, он содержит примесь зараженного носителя, выбранного из Al, B, Ga, In и P. Такие несобственные полупроводниковые материалы могут быть либо n-типа, в котором преобладают носители с отрицательным зарядом, либо p-типа, в котором преобладают носители с положительным зарядом. Типичный несобственный полупроводниковый материал p-типа состоит из кремния (Si) или германия (Ge) с примесями зараженного носителя, выбранного из алюминия (Al), бора (B), галлия (Ga) и индия (In); типичный несобственный полупроводниковый материал n-типа состоит из кремния (Si) или германия (Ge), обычно с примесями фосфора (P).

Наночастица, изготовленная из изолирующего материала, имеющего высокую относительную диэлектрическую постоянную (относительную проницаемость), т.е. равную 200 или выше.

Наночастицы, изготовленные или состоящие из изолирующего материала, имеющего высокую относительную диэлектрическую постоянную ϵ_{ijk} (также называемую относительной проницаемостью), обычно изготавливают из материала, имеющего E_g запрещенной зоны, равную 3,0 эВ или выше, обычно при измерении при комнатной температуре (25°C), и относительную диэлектрическую постоянную ϵ_{ijk} , равную 200 или выше, которую обычно измеряют при 20°C-30°C и от 10^2 Гц до инфракрасной частоты (см. например таблицу 12-45 "Permittivity (dielectric constant) of inorganic solid"; Handbook of chemistry and physics; David R. Hide; 88th Edition; Compilation of the static dielectric constant of inorganic solid. K.F. Young and H.P.R. Frederikse. J. Phys. Chem. Ref. Data, Vol. 2, No. 2, 1973).

Такие наночастицы обычно изготавливают из диэлектрического материала, который представляет собой оксид смешанного оксида металла, предпочтительно выбранного из BaTiO₃, KTaNbO₃, KTaO₃, SrTiO₃, BaSrTiO₃ и т.д.

Наночастица, изготовленная из изолирующего материала, имеющего низкую относительную диэлектрическую постоянную (относительную проницаемость), т.е. равную 100 или ниже.

Наночастицы, изготовленные или состоящие из изолирующего материала, имеющего низкую относительную диэлектрическую постоянную обычно изготавливают из материала, имеющего E_g запрещенной зоны, равную 3,0 эВ или выше, обычно при измерении при комнатной температуре (25°C), и относительную диэлектрическую постоянную ϵ_{ijk} , равную 100 или ниже, предпочтительно ниже 50 или ниже 20, которую обычно измеряют при 20°C-30°C и от 10^2 Гц до инфракрасной частоты (см. например таблицу 12-45 "Permittivity (dielectric constant) of inorganic solid"; Handbook of chemistry and physics; David R. Hide; 88th Edition; Compilation of the static dielectric constant of inorganic solid. K.F. Young and H.P.R. Frederikse. J. Phys. Chem. Ref. Data, Vol. 2, No. 2, 1973).

Такие наночастицы обычно изготавливают из диэлектрического материала, выбранного из оксида металла, смешанного оксида металла, металлического элемента из периода 3, 5 или 6 периодической таблицы Менделеева или лантанида, и углеродного материала. Диэлектрический материал предпочтительно выбран из Al₂O₃, LaAlO₃, La₂O₃, CeO₂, SiO₂, SnO₂, Ta₂O₅, ZrO₂, HfO₂, Y₂O₃ и черного технического алмаза.

Форма наночастицы или агрегата наночастиц.

Поскольку форма частицы или агрегата может влиять на их "биосовместимость", предпочтительными являются частица или агрегат, имеющие довольно равномерную форму. Таким образом, по фармакокинетическим причинам предпочтительными являются наночастицы или агрегаты, имеющие по существу сферическую, округлую, овоидную форму. Такая форма также способствует взаимодействию наночастицы или агрегата с клетками или захват клетками. Особенно предпочтительной является сферическая или округлая форма.

Форму наночастицы или агрегата наночастиц обычно оценивают с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ).

Величина или размер наночастицы или агрегата наночастиц.

В рамках сущности изобретения термины "наночастица" или "агрегат наночастиц" относятся к продукту, в частности, синтетическому продукту, имеющему размер в нанометровом диапазоне, как правило, от 1 нм до 500 нм.

Термин "агрегат наночастицы" или "агрегат наночастиц" относится к прочному множеству наночастиц, как правило, ковалентно связанных друг с другом.

Для определения размера наночастицы или агрегата наночастиц можно использовать трансмиссионную электронную микроскопию (ТЕМ). Кроме того, для определения гидродинамического диаметра наночастиц или агрегата наночастиц в растворе можно использовать динамическое рассеяние света (DLS). Эти два способа, кроме того, можно использовать друг за другом для сравнения результатов измерения размеров и подтверждения указанного размера. Предпочтительным способом является DLS (Ref. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis- Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008), в то время как средний гидродинамический диаметр наночастицы или агрегата наночастиц в растворе приводится в значениях интенсивности.

Как правило, наибольшей величиной или размером является диаметр наночастицы округлой или сферической формы или наибольшая длина наночастицы овоидной или овальной формы.

Наибольший размер наночастицы или агрегата, как определено в настоящем описании, обычно составляет от приблизительно 2 нм до приблизительно 250 нм, предпочтительно приблизительно от 4 нм до 10 нм и от приблизительно 100 нм до приблизительно 200 нм, еще более предпочтительно от приблизительно 10 нм до приблизительно 150 нм.

Биосовместимое покрытие наночастиц или агрегатов наночастиц.

В предпочтительном варианте осуществления наночастица или агрегат наночастиц, используемые в контексте настоящего изобретения для получения представляющей интерес композиции, могут быть покрыты биосовместимым материалом, выбранным из средства, демонстрирующего свойство "невидимости". Средство, демонстрирующее свойство "невидимости", может представлять собой любое средство, экспонирующее пространственную группу. Такая группа может быть выбрана, например, из полиакрила-

та; полиакриламида (поли(N-изопропилакриламида)); поликарбамида; биополимера; полисахарида, такого как декстран или ксилан; и коллагена. В другом предпочтительном варианте осуществления наночастицы или агрегаты наночастиц могут быть покрыты биосовместимым материалом, выбранным из средства, позволяющего взаимодействие с биологической мишенью. Такое средство обычно может обеспечивать положительный или отрицательный заряд поверхности наночастицы или агрегата наночастиц. Средство, сообщаемое положительный заряд поверхности наночастицы или агрегата наночастиц, может представлять собой, например, аминопропилтриэтоксисилан или полилизин. Средство, сообщаемое отрицательный заряд поверхности наночастицы или агрегата наночастиц может представлять собой, например, фосфат (например, полифосфат, метафосфат, пирофосфат и т.д.), карбоксилат (например, цитрат или дикарбоновая кислота, в частности, янтарная кислота) или сульфат.

В предпочтительном варианте осуществления наночастица или агрегат наночастиц, используемые в контексте настоящего изобретения, является гидрофильной с нейтральным поверхностным зарядом, или покрыта биосовместимым материалом (т.е. средством покрытия), выбранным из гидрофильного средства, сообщаемого нейтральный заряд поверхности наночастицы. Действительно, когда наночастицы по настоящему изобретению вводят индивидуальному, наночастицы, являющиеся гидрофильными с нейтральным поверхностным зарядом, или наночастицы, покрытые биосовместимым средством, выбранным из гидрофильного средства, сообщаемого нейтральный поверхностный заряд наночастицам, являются особенно преимущественными для оптимизации применения наночастиц для лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома под действием электрического стимула/поля.

Гидрофильное средство, сообщаемое нейтральный поверхностный заряд наночастице или агрегату наночастиц, может представлять собой средство, экспонирующее функциональную группу, выбранную из спирта (R-OH), альдегида (R-COH), кетона (R-CO-R), сложного эфира (R-COOR), кислоты (R-COOH), тиола (R-SH), сахара (например, глюкоза, фруктоза, рибоза), ангидрида (RCOOOC-R) и пиррола. Гидрофильное средство, сообщаемое нейтральный поверхностный заряд наночастице или агрегату наночастиц, может представлять собой мономер, димер, олигомер, полимер или сополимер. Когда средство представляет собой олигомер, оно может представлять собой олигосахарид, такой как циклодекстрин. Когда средство представляет собой полимер, оно может представлять собой полиэфир (такой как поли(молочная кислота) или полигидроксисилановая кислота), простой полиэфир, полиэтиленоксид, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, поликапролактон, поливинилпирролидон, полисахарид, такой как целлюлоза, полипиррол и т.д.

Кроме того, гидрофильное средство, сообщаемое нейтральный поверхностный заряд наночастице или агрегату наночастиц, может представлять собой средство, экспонирующее определенные группы (R-), способные взаимодействовать с поверхностью наночастицы или агрегата наночастиц. R, как правило, выбирают из тиола, силана, карбоновой и фосфатной группы.

Когда наночастица или агрегат наночастиц представляет собой проводниковую или полупроводниковую и металлическую наночастицу, R предпочтительно представляет собой тиол, простой тиоэфир, сложный тиоэфир, дитиолан или карбоновую группу. Предпочтительно, гидрофильное нейтральное средство покрытия выбрано из тиоглюкозы, 2-меркаптоэтанола, 1-тиоглицерина, тиодигликоля и гидроксимасляной кислоты.

Когда наночастица или агрегат наночастиц представляет собой непроводниковую наночастицу на основе оксида или смешанного оксида, R предпочтительно представляет собой силан или фосфатную группу. Предпочтительно, гидрофильное нейтральное средство покрытия представляет собой соединение гидроксиметилтриэтоксисилана, фруктоза-6-фосфата или глюкоза-6-фосфата.

Гидрофильное средство, сообщаемое нейтральный заряд поверхности наночастицы или агрегата наночастиц, может представлять собой цвиттеррионное соединение, такое как аминокислота, пептид, полипептид, витамин или фосфолипид.

Поверхностный заряд наночастицы или агрегата наночастиц обычно определяют, как хорошо известно специалисту в данной области, путем определения зета-потенциала, обычно в воде с концентрацией наночастиц от 0,2 до 10 г/л при pH от 6 до 8, и обычно путем добавления электролитов в концентрациях в воде от 0,001 до 0,2 М, например 0,01 М или 0,15 М. В определенных выше условиях поверхностный заряд наночастицы или агрегата наночастиц обычно составляет от -10 мВ до +10 мВ (что соответствует нейтральному поверхностному заряду), от -20 мВ до +20 мВ, или от -35 мВ до +35 мВ.

Полностью биосовместимое покрытие наночастицы или агрегата может быть преимущественным в контексте настоящего изобретения, чтобы избежать какого-либо электрического заряда на поверхности наночастицы, когда наночастица является гидрофильной с нейтральным поверхностным зарядом. "Полное покрытие" подразумевает наличие очень высокой плотности/компактности биосовместимых молекул, способных образовывать по меньшей мере полный монослой на поверхности частицы.

Биосовместимое покрытие обеспечивает, в частности, стабильность наночастицы в жидкости, такой как физиологическая жидкость (кровь, плазма, сыворотка и т.д.) или любой изотонической среде или физиологической среде, требуемой для введения фармацевтического средства.

Стабильность можно подтверждать путем определения количества сухого экстракта с использованием сушки и количественно определять в суспензии наночастиц до и после фильтрации, обычно через

0,45-мкм фильтр.

Преимущественно покрытие сохраняет целостность частицы *in vivo*, обеспечивает или улучшает ее биосовместимость, и обеспечивает ее необязательную функционализацию (например, спейсерные молекулы, биосовместимые полимеры, нацеливающие агенты, белки и т.д.).

Биосовместимая наночастица или агрегат наночастиц по изобретению не должны ни растворять, ни высвобождать токсические соединения после введения *in vivo* (т.е. при физиологических значениях pH), а также они не должны иметь окислительно-восстановительное поведение в отсутствие электрической стимуляции.

Другой конкретный объект, описанный в настоящем описании, относится к композиции, в частности, фармацевтической композиции, содержащей наночастицы и/или агрегаты наночастиц, такие как определено в настоящем описании выше, предпочтительно вместе с фармацевтически приемлемым носителем или переносчиком.

В частности, в настоящем описании описана композиция для применения для предупреждения или лечения/для применения в предупреждении или лечении неврологического заболевания, как описано в настоящем описании, или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, подвергнутого воздействию электрического поля, где композиция содержит или состоит из наночастиц и/или агрегатов наночастиц и фармацевтически приемлемой подложки, и где материал наночастицы или агрегата наночастиц обычно выбран из проводникового материала, полупроводникового материала, изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} равной 100 или ниже, как объяснено в настоящем описании выше.

В предпочтительном аспекте композиция содержит или состоит из по меньшей мере двух отдельных наночастиц и/или агрегатов наночастиц, причем каждая наночастица или агрегат наночастиц состоит из отдельного материала, обычно выбранного из проводникового материала, полупроводникового материала, изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже.

В конкретном аспекте композиция может содержать наночастицы или агрегаты наночастиц по изобретению вместе с терапевтическим средством. Терапевтическое средство может быть выбрано из любого лекарственного средства, используемого для лечения неврологического расстройства. Терапевтическое средство обычно выбрано из антипсихотических средств, антидофаминергических средств, дофаминергических средств, антихолинергических средств, холинергических средств, антиглутаматергических средств, глутаматергических средств, ингибиторов ацетилхолинэстеразы, антагонистов рецепторов N-метил D-аспартата (NMDA), агонистов гамма-аминомасляной кислоты (GABA), ботулинического токсина, антидистонических лекарственных средств, антиэпилептических лекарственных средств, противосудорожных препаратов, стабилизаторов настроения, антидепрессантов и седативных средств.

Композиция может иметь форму твердого вещества, жидкости (частицы в суспензии), аэрозоля, геля, пасты и т.п. Предпочтительные композиции имеют форму жидкости или геля. Особенно предпочтительные композиции имеют форму жидкости.

Фармацевтически приемлемая основа или носитель, которые используют, могут представлять собой любую классическую основу, известную квалифицированному специалисту, например, такую как солевой раствор, изотонический стерильный буферный раствор, неводный раствор носителя и т.п.

Композиция также может содержать стабилизаторы, подсластители, поверхностно-активные вещества, полимеры и т.п.

Ее можно составлять, например, в форме ампулы, аэрозоля, бутылки, таблетки, капсулы, с использованием способов составления фармацевтических препаратов, известных квалифицированному специалисту.

Наночастицы или агрегаты наночастиц по изобретению можно вводить индивидууму с использованием различных возможных путей, таких как внутривенный, интратекальный, интратекальный, интратекальный, интратекальный или пероральный путь (через рот), предпочтительно с использованием внутривенного или интратекального пути.

В подходящих случаях можно проводить повторяющиеся инъекции или введения наночастиц.

Описанные в настоящем описании наночастицы или агрегаты наночастиц и композиции, содержащие такие наночастицы или агрегаты наночастиц, предназначены для применения у индивидуума, как правило, для применения у животного, предпочтительно у млекопитающего, еще более предпочтительно у человека, как правило, пациента-человека, любого возраста или пола.

Типичное количество(а) наночастиц или агрегатов наночастиц, подлежащих введению в кору головного мозга индивидуума, составляет (ют) от 10^5 до 10^{15} , предпочтительно от 10^7 до 10^{14} , более предпочтительно от 10^9 до 10^{12} . Также типичное количество(а) наночастиц или агрегатов наночастиц, подлежащих введению в кору головного мозга индивидуума, составляет(ют) от 10^2 до 10^{12} наночастиц или агрегатов наночастиц на см^3 .

Типичное количество (а) наночастиц или агрегатов наночастиц, подлежащих введению в глубокие области головного мозга индивидуума, составляет(ют) от 10^4 до 10^{14} , предпочтительно от 10^6 до 10^{12} ,

более предпочтительно от 10^8 до 10^{11} . Также типичное количество(а) наночастиц или агрегатов, подлежащих введению в глубокие области головного мозга индивидуума, составляет(ют) от 10^1 до 10^{11} наночастиц или агрегатов наночастиц на см^3 .

В контексте изобретения воздействие на наночастицы или агрегаты наночастиц электрического поля/стимула эквивалентно воздействию на индивидуума, которому вводили наночастицы или агрегаты наночастиц, электрического поля/стимула.

Также в настоящем описании описан способ предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, где способ включает стадию введения любой из описанных в настоящем описании наночастиц или агрегатов наночастиц индивидууму и стадию воздействия на указанного индивидуума электрического поля/стимула.

Следующий объект, описанный в настоящем описании, относится к набору, содержащему по меньшей мере две отдельные наночастицы и/или по меньшей мере два отдельных агрегата наночастиц, причем каждая наночастица или агрегат наночастиц состоит из отдельного материала, обычно выбранного из проводникового материала, полупроводникового материала, изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, и изолирующего материала с диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже, как описано в настоящем описании.

В конкретном варианте осуществления набор содержит в отдельных контейнерах отдельные наночастицы и/или агрегаты наночастиц, как описано в настоящем описании (которые предназначены для контактирования, обычно смешения, либо *in situ*, т.е. в области-мишени, либо *in vitro* или *ex vivo*, до помещения смеси в область-мишень).

Следующий объект относится к набору, дополнительно содержащему по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, отличное от наночастиц или агрегатов наночастиц, как описано в настоящем описании, такое как антипсихотическое средство, антидофаминергическое средство, дофаминергическое средство, антихолинергическое средство, холинергическое средство, антиглутаматергическое средство, глутаматергическое средство, ингибитор ацетилхолинэстеразы, антагонист рецептора N-метил D-аспартата (NMDA), агонист гамма-аминомасляной кислоты (GABA), ботулинического токсина, антидистонического лекарственного средства, антиэпилептического лекарственного средства, противосудорожных препаратов, стабилизатора настроения, антидепрессанта и седативного средства, которое специалист в данной области способен выбрать в зависимости от природы целевого заболевания.

Также в настоящем описании описано применение, *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*, такого набора в способе предупреждения или лечения неврологического заболевания, как описано в настоящем описании, или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума. Также в настоящем описании описан набор, как описано в настоящем описании, для применения для предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума.

Целью настоящего изобретения является лечение неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома благодаря использованию наночастиц или агрегатов наночастиц, подвергавших воздействию электрического стимула/поля.

Описано, что на уровне нейронов наночастицы усиливают или ингибируют электрическую возбудимость нейронов. Например, было обнаружено, что оксид цинка, углеродные нанотрубки и золотые наночастицы усиливают электрическую возбудимость нейронов, в то время как оксид меди, серебро, уголь, оксид железа и оксид титана ингибируют электрическую возбудимость нейронов (Polak P & Shefi O. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11 (2015) 1467-1479, *Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles*).

Исследования системного влияния на нейрональные системы покрытых наночастиц серебра (сAgNP) - с использованием амфифильного полимера полиэтиленгликоля - [сAgNP с гидродинамическим диаметром $13 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (технология динамического рассеяния света) и зета-потенциалом -69 мВ (Zeta-sizer Nano) в чистой воде]) продемонстрировали, что наночастицы индуцировали изменения механизма, влияющего на возбудимость. Помимо этого, стимуляция нейрональной сети продемонстрировала, что индуцируемые локально посредством сAgNP изменения приводят к активности всей сети, что указывает на то, что локальное применение сAgNP может влиять на активность всей сети (Busse M. et al., *International Journal of Nanomedicine* 2013:8 3559-3572, *Estimating the modulatory effects of nanoparticles on neuronal circuits using computational upscaling*).

Также было описано, что увеличенная возбудимость нейронов, ассоциированная с внутриклеточными наночастицами золота, потенциально может оказать вредоносные эффекты на нейроны в патологических условиях, таких как припадок (Jung S, et al., *PLOS ONE* 2014, 9(3) e91360, *Intracellular gold nanoparticles increase neuronal excitability and aggravate seizure activity in the mouse brain*).

Наночастицы или агрегаты наночастиц по настоящему изобретению, когда их подвергают воздействию электрического поля/стимула для применения для предупреждения или лечения/для применения в предупреждении или лечении неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома, действуют путем нормализации синхронизации колебаний в и/или между нейрональными сетями в и/или между отдельными областями головного мозга.

Как проиллюстрировано на фиг. 2 и 3, обмен информацией в пределах области и/или между различными областями головного мозга нарушается при неврологических заболеваниях. В зависимости от неврологического расстройства и ассоциированных с ним симптомов, воздействие на конкретную область головного мозга наночастиц по настоящему изобретению (см. табл. 2), когда они комбинированы с электрическим стимулом, улучшают обмен информацией посредством нормализации синхронизации колебаний внутри нейрональной сети и/или между нейрональными сетями внутри области и/или между различными областями головного мозга (т.е. нормализации когеренции) (фиг. 4 и 5 и табл. 2).

Таблица 2

Комбинация типа наночастиц с типом способа электрической стимуляции для лечения различных неврологических нарушений

Тип наночастиц (или агрегата наночастиц)	Тип материала	Целевое заболевание	Целевая область	Тип стимуляции
Наночастица 1 (NP1)	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≤ 100	Двигательные нарушения	Глубокие области головного мозга	Глубокая стимуляция головного мозга (DBS)
	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≥ 200			
	Полупроводниковый			
	Проводниковый			
NP1	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≤ 100	Двигательные нарушения	Кора головного мозга	Транскраниальная электрическая стимуляция (TES) и Транскраниальная магнитная стимуляция (TMS)
	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≥ 200			
	Полупроводниковый			
	Проводниковый			
Наночастица 2 (NP2)	Проводниковый	Психиатрические и когнитивные расстройства	Глубокие области головного мозга	DBS
	Полупроводниковый			
	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≥ 200			
	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≤ 100			
NP2	Проводниковый	Психиатрические и когнитивные расстройства	Кора головного мозга	TES и TMS
	Полупроводниковый			
	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≥ 200			
	Изолирующий диэлектрическая постоянная ≤ 100			

Как хорошо понятно специалисту в данной области, эффекты электрической стимуляции на нейрональные сети связаны с глубиной проникновения и пространственным разрешением электрического поля в целевой области головного мозга. Низкое пространственное разрешение и глубина проникновения являются существенным недостатком электрической стимуляции. Присутствие наночастиц или агрегатов частиц по изобретению теперь позволяет усилить пространственное разрешение (очаговость) электриче-

ского поля, где локализуются наночастицы, и увеличить глубину проникновения электрического тока (увеличить его терапевтический эффект).

Присутствие наночастиц или агрегатов наночастиц в ткани-мишени позволяет снизить порог применимого/индуцируемого электрического стимула, требуемого для нейрональной стимуляции, т.е. оно уменьшает величины используемых параметров, таких как ток, напряжение, длительность и/или частота импульса. Кроме того, этот эффект уменьшает потенциальную токсичность, связанную с примененным/индуцированным электрическим током. Это также может иметь технологическое значение, такое как увеличение срока службы батареи внутреннего генератора импульсов (IPG) или модификация (уменьшение) размера и геометрии электродов DBS.

Примеры, которые следуют далее, и соответствующие им чертежи иллюстрируют изобретение без ограничения его объема.

Чертежи

Фиг. 1. Схематическое представление головного мозга (сагиттальная плоскость).

Фиг. 2. Гиперсинхрония и сниженная синхрония между двумя нейрональными сетями.

Фиг. 3. Области головного мозга, вовлеченные в различные неврологические заболевания.

Фиг. 4. Эффект наночастиц (NP1) под действием электрического поля (E) на нормализацию гиперсинхронии (двигательные нарушения).

Фиг. 5. Эффект наночастиц (NP2) под действием электрического поля (E) на нормализацию сниженной синхронии (психиатрические и когнитивные расстройства).

Фиг. 6. Схема эксперимента для индукции болезни Паркинсона посредством введения MPP⁺ и регистрации электрической активности.

Сокультуры вентральной области среднего отдела головного мозга/коры мыши получали от мышей E14.5 NMRI и культивировали в 48-луночных MEA в течение 3 недель (период культивирования).

Культуры обрабатывали после культивирования в течение 7 суток (сутки 7) суспензиями наночастиц (группы "наночастиц") или водой ("контрольная" группа и группа "MPP⁺") и на 8 сутки посредством MPP⁺ (20 мкМ) (группы "наночастиц" и группа "MPP⁺") или воды ("контрольная" группа). Самопроизвольную активность регистрировали на 21 сутки. После регистрации на 21 сутки культуры подвергали электрической стимуляции на одном электроде и регистрацию активности проводили на не стимулирующих электродах.

Фиг. 7. Схема двух упрощенных разрядов, описывающая некоторые из параметров, которые могут быть определены при регистрации электрической активности. Указаны параметры, описывающие общую активность (пиковый потенциал, разряд, интервал между разрядами (IBI) и период разряда) и структуру разряда (длительность разряда, плато разряда, амплитуда разряда, интервал между пиковыми потенциалами разряда (ISI) и площадь разряда). Стандартные отклонения (SD) этих параметров являются мерами регулярности общей активности и структуры разряда, соответственно. Коэффициент вариаций во времени (CVtime) отражает регуляцию по времени паттерна активности каждого элемента. CVtime вычисляют из соотношения стандартного отклонения и среднего значения параметров. Коэффициент вариации сети (CVnet) отражает синхронизацию между нейронами в пределах сети. CVnet вычисляют из соотношения стандартного отклонения и среднего значения параметра в пределах сети. Большие величины CVnet подразумевают широкий диапазон вариации активности в пределах сети, что означает меньшую синхронизацию.

Фиг. 8. Функциональные эффекты, наблюдаемые в группах "наночастиц" при электрической стимуляции по сравнению с "контрольной" группой (при электрической стимуляции) и группой "MPP⁺" (при электрической стимуляции), на активность сетей среднего мозга/коры. Все индуцируемые MPP⁺ функциональные эффекты на активность сети при электрической стимуляции в присутствии или в отсутствии исследуемых частиц, а также "контрольной" группы (при электрической стимуляции), приведены к активности "до стимуляции", т.е. активности, определенной на сутки 21, взятой за 100%, для каждого эксперимента. Данные демонстрируют индуцируемые MPP⁺ функциональные эффекты при электрической стимуляции и демонстрируют эффективность наночастиц по изобретению в отношении предупреждения/восстановления при электрической стимуляции (т.е. способность предупреждать/восстанавливать функциональные эффекты до уровня, сходного с уровнями "контрольной" группы).

Фиг. 9. Анализ показателя эффекта для групп "наночастиц", "контрольной" группы (показатель эффекта=0) и группы "MPP⁺" (показатель эффекта=1).

Фиг. 10. Схема эксперимента по индукции болезни Альцгеймера путем обработки амилоидом-бета 1-42 (A_β 1-42) и регистрации электрической активности. После культивирования в течение 4 недель (период культивирования), к нейрональной сети добавляли A_β 1-42 (100 нМ) (группа "наночастиц" и группа "A_β") или воду ("контрольная" группа) (T₀). Через четыре (4) часа добавляли суспензии наночастиц (группы "наночастиц") или воду ("контрольная" группа и группа "A_β"). Спонтанную активность регистрировали следующим образом:

в момент времени T₀ (перед добавлением A_β 1-42)

в момент времени T₀+1 ч, T₀+2 ч, T₀+3 ч, T₀+4 ч (перед добавлением наночастиц или воды), T₀+5 ч и T₀+6 ч.

Фиг. 11. Функциональные эффекты, наблюдаемые в группах "наночастиц" при электрической стимуляции, по сравнению с "контрольной" группой (при электрической стимуляции) и группой "Abeta 1-42" (при электрической стимуляции) на активность сети коры головного мозга. Все функциональные эффекты, индуцируемые Abeta 1-42, на активность сети при электрической стимуляции в присутствии или в отсутствие исследуемых наночастиц, а также в "контрольной" группе (при электрической стимуляции), приведены к активности "до стимуляции", т.е. активности, определенной в момент времени T0+6 ч, взятый за 100% для каждого эксперимента.

Данные демонстрируют функциональные эффекты Abeta 1-42 при электрической стимуляции и демонстрируют эффективность наночастиц по изобретению в отношении восстановления обеспечиваемую при электрической стимуляции (т.е. способность восстанавливать функциональные эффекты до уровня, сходного с уровнями "контрольной" группы).

Фиг. 12. Анализ показателя эффектов для групп "наночастиц", "контрольной" группы (показатель эффекта=0) и группы "Abeta" (показатель эффекта=1).

Примеры

Имитация.

Для оценки эффекта наночастиц, подвергнутых воздействию электрического стимула (электрического поля), на нейрональную сеть(и) можно использовать имитацию.

Исследования нейронов *in vitro*.

На уровне нейронов метод фиксации потенциала является в высокой степени пригодным для детекции потенциалов действия, поскольку он позволяет одновременное прямое измерение и контроль мембранного потенциала нейрона.

Этот способ используют для оценки эффектов наночастиц на единичный нейрон.

Исследования сети нейронов *in vitro*.

Мультиэлектродные матрицы (МЕА) позволяют стимуляцию и регистрацию большого количества нейронов (нейрональная сеть). Диссоциированные нейрональные культуры на МЕА обеспечивают упрощенную модель, в которой манипулирование активности сети можно проводить посредством последовательностей электрической стимуляции через множество электродов матрицы. Этот способ является в высокой степени пригодным для оценки физиологически значимых параметров на уровне сети и клеток, что позволяет лучше понять функцию и дисфункцию головного мозга.

Для лучшего понимания комплексности сетей головного мозга в реальности используют диссоциированные нейрональные культуры, сопряженные с МЕА. Кроме того, использование диссоциированных нейрональных совокупностей позволяет манипулирование и контроль связей в сети. Использование диссоциированных нейрональных культур, сопряженных с МЕА, позволяет схемы экспериментов, где нейроны можно подвергать внеклеточной стимуляции посредством электрических импульсов, доставляемых через одни и те же электроды устройства. Таким образом, становится обоснованным исследование того, как возникающую нейрональную динамику можно модулировать посредством электрической стимуляции и, следовательно, модифицируется ли лежащая в ее функциональная взаимосвязь (Poll D. et al., *Frontiers in Neural Circuits*, 2015, 9 (article 57), 1-14: Functional connectivity in *in vitro* neuronal assemblies).

Система МЕА позволяет неинвазивную длительную одновременную регистрацию из множества областей нейрональной сети в реальном времени, что увеличивает пространственное разрешение и, тем самым, обеспечивает надежный показатель активности сети. Одновременное получение данных о потенциале действия и потенциале поля на протяжении длительных периодов времени позволяет мониторинг функций сети, которые возникают в результате взаимодействия всех клеточных механизмов, ответственных за генерирование пространственно-временного паттерна (Johnstone A. F. M. et al., *Neurotoxicology* (2010), 31: 331-350, *Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century*). По сравнению со способами регистрации посредством фиксации потенциала и другими одноэлектродными способами регистрации, МЕА позволяет определить ответы всей сети, интегрируя общую информацию о взаимодействии всех рецепторов, синапсов и типов нейронов, которые присутствуют в сети (Novellino A. et al., *Frontiers in Neuroengineering*. (2011), 4(4), 1-14, *Development of micro-electrode array based tests for neurotoxicity: assessment of interlaboratory reproducibility with neuroactive chemicals*). По существу, регистрация МЕА используется для понимания нейрональной коммуникации, кодирования, распространения и обработки информации в культурах нейронов (Taketani, M., and Baudry, M. (2006). *Advances in Network Electrophysiology*. New York, NY: Springer; Obien et al., *Frontiers in Neurosciences*, 2015, 8(423): Revealing neuronal functions through microelectrode array recordings). Технология МЕА является передовым способом фенотипического многопараметрического скрининга для охарактеризации функциональных изменений в активности сети в электрически активных культурах клеток, и она является очень чувствительной к нейрогенезу, а также к нейрорегенеративным и нейродегенеративным аспектам. Более того, известно, что нейрональные сети, выращенные на МЕА, способны отвечать на нейроактивные или нейротоксические соединения приблизительно в тех же диапазонах концентраций, которые изменяют функции интактной нервной системы млекопитающего (Xia et al., *Alcohol*, 2003, 30, 167-174: *Histiotypic electrophysiological responses of cultured neuronal networks to ethanol*; Gramowski et al., *European Journal of Neuroscience*, 2006, 24, 455-465: *Functional screening of traditional antidepressants with primary*

cortical neuronal networks grown on multielectrode neurochips; Gramowski et al. , *Frontiers in Neurology*, 2015, 6(158): Enhancement of cortical network activity in vitro and promotion of GABAergic neurogenesis by stimulation with an electromagnetic field with 150MHz carrier wave pulsed with an alternating 10 and 16 Hz modulation).

Этот способ используют для оценки эффекта наночастиц на нейрональную сеть(и).

Исследования сети нейронов *in vivo*.

Подходящей моделью на животных считается оценка эффекта наночастиц по изобретению на нейрональные сети животных, когда их подвергают воздействию электрического стимула.

Например, модели болезни Паркинсона на мышах используют для оценки эффектов наночастиц, стимулированных tDCS (транскраниальная стимуляция постоянным током) на смягчение нарушения поведения (двигательные нарушения). Также используют модели болезни Альцгеймера на крысах для оценки эффектов наночастиц, стимулированных tDCS, на дисфункцию пространственного обучения и памяти (когнитивные расстройства).

Пример 1. Наночастицы, изготовленные из проводникового материала: синтез золотых наночастиц, покрытых биосовместимым покрытием, имеющих нейтральный заряд поверхности.

Золотые наночастицы синтезировали путем восстановления соли золота с хлором (HAuCl_4) с защитным средством (цитрат натрия) (протокол на основе G. Frens *Nature Physical Science* 241 (1973) 21). В типичном эксперименте раствор HAuCl_4 нагревали до кипения. Затем добавляли раствор цитрата натрия. Полученный раствор поддерживали в состоянии кипения в течение дополнительных 5 мин.

Проводили фильтрацию через 0,22-мкм фильтр (фильтрующая мембрана: поли(эфирсульфон) (PES)) суспензии наночастиц и концентрацию золота в суспензии определяли посредством спектроскопии в видимой УФ-области при 530 нм.

Нанесение покрытия на поверхность проводили с использованием α -метокси- ω -меркаптополи (этиленгликоля), 20 кДа ("тиол-PEG20 кДа"). К суспензии наночастиц добавляли достаточное количество "тиол-PEG 20 кДа" для обеспечения по меньшей мере половины монослойного покрытия (2,5 молекулы/нм²) на поверхности золотых наночастиц. Значение pH довели до 7-7,2 и суспензию наночастиц перемешивали в течение ночи.

Гидродинамический диаметр (в значениях интенсивности) определяли посредством динамического рассеяния света (DLS) с использованием Nano-Zetasizer (Malvern) с углом рассеяния 173° с использованием лазера с испусканием при 633 нм путем разбавления суспензии наночастиц в воде (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что полученный таким образом гидродинамический диаметр биосовместимых золотых наночастиц в суспензии равен 118 нм с индексом полидисперсности (дисперсия популяции наночастиц по размеру) 0,13.

Зета-потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности наночастиц (Nano-Zetasizer, Malvern) посредством разбавления суспензии наночастиц в растворе NaCl в концентрации 1 мМ при pH 7 (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что зета-потенциал при pH 7 равен -1 мВ.

Пример 2. Наночастицы, изготовленные с проводниковым материалом: синтез золотых наночастиц с биосовместимым покрытием, имеющих отрицательный заряд поверхности.

Золотые наночастицы получали, как описано в примере 1 (та же золотая неорганическая сердцевина).

Проводили фильтрацию через 0,22-мкм мембранный фильтр PES и концентрацию золота в суспензии определяли посредством спектроскопии в видимой УФ-области при 530 нм.

Нанесение биосовместимого покрытия на поверхность проводили с использованием мезо-2,3-димеркаптоянтарной кислоты (DMSA). К суспензии наночастиц добавляли достаточное количество DMSA для достижения по меньшей мере половины монослойного покрытия (2,5 молекулы/нм) на поверхности. Значение pH довели до 7-7,2 и суспензию наночастиц перемешивали в течение ночи.

Гидродинамический диаметр (в значениях интенсивности) определяли посредством динамического рассеяния света (DLS) с использованием Nano-Zetasizer (Malvern) с углом рассеяния 173° с использованием лазера с испусканием при 633 нм путем разбавления суспензии наночастиц в воде (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что полученный таким образом гидродинамический диаметр биосовместимых золотых наночастиц в суспензии равен 76 нм с индексом полидисперсности (дисперсия популяции наночастиц по размеру) 0,46.

Зета-потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности наночастиц (Nano-Zetasizer, Malvern) посредством разбавления суспензии наночастиц в растворе NaCl в концентрации 1 мМ при pH 7 (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что зета-потенциал при pH 7 равен -23 мВ.

Пример 3. Наночастицы, изготовленные с изолирующим материалом, имеющим низкую относительную диэлектрическую постоянную, равную 100 или ниже: синтез наночастиц на основе оксида циркония, покрытых биосовместимым покрытием, имеющим нейтральный поверхностный заряд.

Наночастицы оксида циркония (ZrO_2) синтезировали путем преципитации хлорида циркония (ZrCl_4) с гидроксидом тетраметиламмония (ТМАОН) при основных значениях pH. Полученную суспензию пе-

ренили в автоклав и нагревали при температуре выше 110°C. После охлаждения суспензию промывали деионизированной водой и подкисляли.

Проводили фильтрацию через 0,22-мкм мембранный фильтр PES и концентрацию наночастиц (ZrO_2) определяли путем высушивания водного раствора в порошок и взвешивания полученной таким образом массы.

Нанесение биосовместимого покрытия проводили с использованием силан-поли(этилен)гликоля 2 кДа ("Si-PEG 2 кДа"). К суспензии наночастиц добавляли достаточное количество "Si-PEG 2 кДа" для обеспечения по меньшей мере половины монослойного покрытия (2,5 молекулы/нм²) на поверхности. Суспензию наночастиц перемешивали в течение ночи, а затем pH доводили до 7.

Гидродинамический диаметр (в значениях интенсивности) определяли посредством динамического рассеяния света (DLS) с использованием Nano-Zetasizer (Malvern) с углом рассеяния 173° с использованием лазера с испусканием при 633 нм путем разбавления суспензии наночастиц в воде (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что полученный таким образом гидродинамический диаметр биосовместимых золотых наночастиц в суспензии равен 55 нм с индексом полидисперсности (дисперсия популяции наночастиц по размеру) 0,1.

Зета-потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности наночастиц (Nano-Zetasizer, Malvern) посредством разбавления суспензии наночастиц в растворе NaCl в концентрации 1 мМ при pH 7 (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что зета-потенциал при pH 7 равен -1 мВ.

Пример 4. Наночастицы, изготовленные с изолирующим материалом, имеющим низкую относительную диэлектрическую постоянную, равную 100 или ниже: синтез наночастиц оксида циркония, покрытых биосовместимым покрытием, имеющим отрицательный заряд поверхности.

Наночастицы оксид циркония получали, как описано в примере 3 (та же неорганическая сердцевина).

Проводили фильтрацию через 0,22-мкм мембранный фильтр PES и концентрацию наночастиц (ZrO_2) определяли путем высушивания водного раствора в порошок и взвешивания полученной таким образом массы.

Функционализацию поверхности проводили с использованием гексаметафосфата натрия. К суспензии наночастиц добавляли достаточную массу гексаметафосфата натрия для обеспечения по меньшей мере половины монослойного покрытия (2,5 молекулы/нм²) на поверхности. Суспензию наночастиц перемешивали в течение ночи, а затем pH доводили до 7.

Гидродинамический диаметр (в значениях интенсивности) определяли посредством динамического рассеяния света (DLS) с использованием Nano-Zetasizer (Malvern) с углом рассеяния 173° с использованием лазера с испусканием при 633 нм путем разбавления суспензии наночастиц в воде (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что полученный таким образом гидродинамический диаметр биосовместимых золотых наночастиц в суспензии равен 70 нм с индексом полидисперсности (дисперсия популяции наночастиц по размеру) 0,11.

Зета-потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности наночастиц (Nano-Zetasizer, Malvern) посредством разбавления суспензии наночастиц в растворе NaCl в концентрации 1 мМ при pH 7 (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что зета-потенциал при pH 7 равен -33 мВ.

Пример 5. Наночастицы, изготовленные с полупроводниковым материалом: кремниевые наночастицы, покрытые биосовместимым покрытием, имеющим отрицательный заряд поверхности.

Кремниевые (Si) наночастицы (порошок) получали от US Research Nanomaterials Inc. Их диспергировали в воде в количестве 30 г/л при обработке ультразвуком (с электродом).

Проводили фильтрацию через 0,22-мкм мембранный фильтр PES и концентрацию наночастиц (Si) определяли путем высушивания суспензии в порошок и взвешивания полученной таким образом массы.

Гидродинамический диаметр (в значениях интенсивности) определяли посредством динамического рассеяния света (DLS) с использованием Nano-Zetasizer (Malvern) с углом рассеяния 173° с использованием лазера с испусканием при 633 нм путем разбавления суспензии наночастиц в воде (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что полученный таким образом гидродинамический диаметр биосовместимых золотых наночастиц в суспензии равен 164 нм с индексом полидисперсности (дисперсия популяции наночастиц по размеру) 0,16.

Зета-потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности наночастиц (Nano-Zetasizer, Malvern) посредством разбавления суспензии наночастиц в растворе NaCl в концентрации 1 мМ при pH 7 (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что зета-потенциал при pH 7 равен -19 мВ.

Пример 6. Наночастицы, изготовленные с изолирующим материалом, имеющим высокую относительную диэлектрическую постоянную, равную 200 или выше: наночастицы титаната бария, покрытые биосовместимым покрытием, имеющим отрицательный поверхностный заряд.

Суспензию наночастиц титаната бария ($BaTiO_3$) (20 мас.%, в воде) получали из US Research Materials Inc. (US3835).

Функционализацию проводили с использованием силан-поли(этилен)гликоля 10 кДа ("Si-PEG 10 кДа"). В кратком изложении, "Si-PEG 10 кДа" сначала растворяли в растворе этанол/вода (1/3 об./об.) и добавляли к суспензии BaTiO₃ (20 мас.%, в воде) для обеспечения полного монослойного покрытия на поверхности наночастиц. Суспензию обрабатывали ультразвуком, а затем перемешивали в течение ночи. После фильтрации через 0,22-мкм фильтр (фильтрующая мембрана: поли(эфирсульфон)), проводили стадию промывания для удаления не вступившего в реакцию полимера "Si-PEG 10 кДа".

Гидродинамический диаметр (в значениях интенсивности) определяли посредством динамического рассеяния света (DLS) с использованием Nano-Zetasizer (Malvern) с углом рассеяния 173° с использованием лазера с испусканием при 633 нм путем разбавления суспензии наночастиц в воде (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что полученный таким образом гидродинамический диаметр биосовместимых золотых наночастиц в суспензии равен 164 нм с индексом полидисперсности (дисперсия популяции наночастиц по размеру) 0,16.

Зета-потенциал определяли путем измерения электрофоретической подвижности наночастиц (Nano-Zetasizer, Malvern) посредством разбавления суспензии наночастиц в растворе NaCl в концентрации 1 мМ при pH 7 (конечная концентрация: 0,1 г/л). Было обнаружено, что зета-потенциал при pH 7 равен -19 мВ.

Пример 7. Оценка эффективности наночастиц согласно примерам 1, 2, 5 и 6, подвергнутых электрической стимуляции, в отношении предупреждения/восстановления на MPP⁺-индуцированных нейронных сетях с использованием технологии фенотипического скрининга на MEA.

Эффективность наночастиц по изобретению в отношении предупреждения/восстановления исследовали на обработанных MPP⁺ сокультурах вентральной области среднего мозга/коры мыши, культивированных на 48-луночных MEA в течение 3 недель. Эта модель соответствует модели болезни Паркинсона *in vitro* для скрининга соединений на основе функционального восстановления дофаминергических нейронов с использованием обработанных культур среднего мозга/коры, выращиваемых в MEA. Средний мозг представляет собой область головного мозга, включающую черную субстанцию, которая является частью базальных ганглиев и которая содержит большинство дофаминергических нейронов. Оценку эффекта наночастиц в отношении предупреждения/восстановления проводили путем определения внеклеточной электрической активности сокультуры нейронов, посеянной на чипы микроэлектродной матрицы (MEA).

Индукцию фенотипа паркинсонизма в нейронах мыши *in vitro* проводили с использованием йодида 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP⁺). Существуют убедительные доказательства, что в патогенезе болезни Паркинсона (PD) участвует митохондриальное нарушение. Было обнаружено, что MPP⁺ является митохондриальным ядом, который ингибирует клеточное дыхание посредством блокады комплекса I ферментов переноса электронов (NADH: убихинооксидоредуктаза). Несколько лабораторий сообщили, что в черной субстанции полученных после смерти тканей пациентов с PD существует селективный дефект в комплексе I митохондриальной цепи переноса электронов, а также в тромбоцитах пациентов с ранней PD происходит снижение активности комплекса I (Peng J. et al., Journal of Biomolecular screening., 2013, 18(5), 522-533: Using human pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons to evaluate candidate Parkinson's disease therapeutic agents in MPP⁺ and rotenone models.).

Материалы и способы.

Первичная клеточная культура, условия обработки и электрическая стимуляция.

Средний мозг извлекали из мышей chr:NMRI на сутки 14,5 эмбрионального развития (Charles River). Мышей умерщвляли смещением позвонков. Ткань диссоциировали расщеплением ферментами (133,3 единиц Кунитца/мл ДНКазы; 10 единиц/мл папаина) и механическим растиранием, подвергали подсчету, контролю жизнеспособности и высевали в 2 0-мкл каплю DMEM, содержащую ламинин (10 мкг/мл), 10% эмбриональную телячью сыворотку и 10% сыворотку лошади в MEA. Культуры в MEA инкубировали при 37°C в атмосфере 10% CO₂ до тех пор, пока они не становились готовыми для применения. Культуральную среду восполняли два раза в неделю посредством DMEM, содержащей 10% сыворотку лошади.

В группах "наночастиц" лунки обрабатывали на 7 сутки суспензией наночастиц (800 мкМ) из примеров 1, 2, 5 и суспензией наночастиц (2000 мкМ) из примера 6, а затем 20 мкМ MPP⁺ на 8 сутки. В "контрольной" группе в лунки добавляли воду на 7 сутки, а затем добавляли воду на 8 сутки. В группе "MPP⁺" в лунки добавляли воду на 7 сутки, а затем 20 мкМ MPP⁺ на 8 сутки. Через двадцать четыре (24) часа после добавления MPP⁺ (или воды для "контрольной" группы) среду заменяли для обеспечения вымывания MPP⁺. Затем среду заменяли два раза в неделю.

На 21 сутки регистрировали нейрональную активность в течение 120 мин и анализировали стабильную активность в течение 30 мин. После регистрации на 21 сутки все лунки активировали посредством электрических стимулов на одном из активных электродов, обеспечивающих пиковый потенциал.

Стимуляцию проводили в течение 30 мин (стимуляция 1 электрода на лунку в 48 лунках MEA, минимальная длительность стимуляции=100 мкс, устранение артефактов - 2 мс на импульс, импульс 10х двухфазный ±500 мВ). Ответ не стимулирующих электродов усредняли и приводили к активности до стимуляции (фиг. 6).

Нейрочипы микроэлектродных матриц.

Нейрочипы 48-лучочных микроэлектродных матриц приобретали от Axion Biosystems Inc. Эти чипы имеют 16 пассивных электродов на лунку. Поверхность закрывали на 1 ч полиэтиленгликолем (PEG, 50% в боратном буфере), промывали и сушили воздухом.

Многоканальная регистрация и многопараметрический анализ данных.

Для регистрации использовали многоканальную систему регистрации MAESTRO от Axion Biosystems (США). Для внеклеточной регистрации 48-лучочные MEA устанавливали в регистрирующую станцию MAESTRO и поддерживали при 37°C. Регистрацию проводили в DMEM/10% инактивированной сыворотке лошади. Значение pH поддерживали при 7,4 с непрерывным потоком фильтрованного увлажненного воздуха с 10% CO₂.

Каждый элемент соответствует активности одного нейрона, регистрируемой одним электродом. В начале регистрации элементы были разделены. Для каждого элемента регистрировали потенциалы действия (т.е. пиковые потенциалы), в виде последовательностей пиковых потенциалов, которые кластеризуются в так называемые "разряды". Разряды количественно описывали посредством прямого анализа последовательностей пиковых потенциалов с использованием программ Spike Wrangler и NPWaveX (both NeuroProof GmbH, Rostock, Германия). Разряды определялись началом и концом коротких событий пиковых потенциалов (фиг. 7).

С использованием одновременного многопараметрического анализа паттернов активности сети было получено 204 описывающих активность параметра последовательностей пиковых потенциалов. Эти параметры позволяют получить точное описание изменений активности в следующих четырех категориях: общая активность, структура разряда, характеристики колебаний и синхронность.

Изменения "общих параметров активности" описывают эффекты на частоту испускания потенциалов действия (частоту спайков), скорость разрядов и период разряда в качестве времени между разрядами.

"Параметры структуры разрядов" определяют не только внутреннюю структуру потенциалов действия в фазу высокочастотных пиковых потенциалов действия ("разряда"), например, частоту потенциалов действия при разрядах, скорость потенциалов действия при разрядах, и плотность потенциалов действия при разрядах, но также и общую структуру разряда, такую как длительность, площадь и плато.

"Характеристики колебаний" количественно определяют регулярность возникновения или структуру разрядов, которые вычисляют с помощью коэффициентов вариаций первичных параметров активности, описывающих вариабельность параметров (общая активность, структура разряда) в экспериментальных эпизодах (Gramowski A. et al., Eur. J. Neurosci., 2004, 19, 2815-2825: Substance identification by quantitative characterization of oscillator activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays). Более высокие величины указывают на менее регулярную структуру разряда или менее регулярную общую активность (например, генерирование потенциалов действия, разрядов).

В качестве меры синхронности последовательностей потенциалов действия, "параметры CVnet" отражают "синхронизацию" между нейронами в сети (Gramowski A. et al., Eur. J. Neurosci., 2004, 19, 2815-2825: Substance identification by quantitative characterization of oscillator activity in murine spinal cord networks on microelectrode arrays). CVnet представляет собой коэффициент вариаций на протяжении сети. Большие величины CVnet подразумевают широкий диапазон вариаций активности в сети, что означает меньшую синхронизацию (Gramowski A. et al., Frontiers in Neurology, 2015, 6(158): Enhancement of cortical network activity in vitro and promotion of GABAergic neurogenesis by stimulation with an electromagnetic field with 150MHz carrier wave pulsed with an alternating 10 and 16 Hz modulation).

Функциональные эффекты, индуцируемые MPP⁺, в отношении нейрональной сети при электрической стимуляции и эффективность наночастиц по изобретению в отношении предупреждения/восстановления при электрической стимуляции оценивали с помощью описанных выше параметров (также некоторые из них повторены в таблице 3 ниже).

Таблица 3

Описывающие активность параметры из многопараметрического анализа данных в четырех следующих категориях: общая активность, структура разряда, характеристики колебаний и синхронность

Общая активность	Частота потенциалов действия	Количество потенциалов действия в секунду, усредненное для всех зарегистрированных последовательностей потенциалов действия
Структура разряда	Длительность разряда	Средняя длительность разрядов (мс)
Характеристики и колебаний	CVtime для площади	Коэффициент вариаций по времени для площади под кривой после

	разряда	интегрирования разрядов, определяемый длительностью разряда, количеством потенциалов действия в разрядах, частотой потенциалов действия в разрядах. Этот параметр описывает изменчивость площади разряда в пределах экспериментальных эпизодов. Более высокие величины указывают на менее регулярную структуру
	CVtime для высоты частоты пиков разряда	Коэффициент вариаций во времени для максимальной частоты пиков единичных потенциалов действия при разрядах. Более низкие величины представляют собой величину, указывающую на более высокую регулярность пиковой частоты разряда, и вместе с тем на более высокую степень регулярной структуры разряда в пределах экспериментальных эпизодов.
	Сумма CVtime для длительности и разряда	Коэффициент вариаций во времени для длительности разряда, отражающий изменчивость длительности разряда в экспериментальных эпизодах.
	Сумма SD периода разряда	Стандартное отклонение периода разряда, отражающее вариации отдельных единичных расстояний между последовательными разрядами в пределах экспериментальных эпизодов. Более низкие величины отражают более высокую регулярность структуры разряда.

Синхронность	CVnet частоты разряда	CVnet для скорости разряда, отражающий вариации частоты разряда в сети в ходе экспериментальных эпизодов
	CVnet периода разряда	CVnet периода разряда (расстояние между началом последовательных разрядов), отражающий вариацию "генерируемости разрядов" в пределах экспериментального эпизода по всей сети. Уменьшение этого параметра отражает увеличение синхронизации в сети.
	CVnet для % потенциалов действия в разряде	CVnet процента потенциалов в разрядах, отражающий вариации доли потенциалов действия в интервалах разряда для всех потенциалов действия в экспериментального эпизода по всей сети. Уменьшение этого параметра отражает увеличение синхронизации в сети.
	SynAll	Среднее расстояние между разрядами в популяционном разряде из центра разряда совокупности. SynAll является показателем устойчивости синхронности сети.

Индукцируемые MPP⁺ функциональные эффекты на активность сети при электрической стимуляции в присутствии или в отсутствии исследуемых наночастиц приводили к активности "до стимуляции", т.е. активности, определенной на 21 сутки, взятой за 100% для каждого эксперимента. Величины, связанные со спонтанной нативной активностью, определяли из сгруппированных по 60 с данных, полученных для периода 30 мин после стабилизации активности в течение 30 мин. Результаты (величины параметров) выражали в качестве среднего значения \pm SEM для независимых сетей. Для каждой группы "наночастиц" в анализ было включено по меньшей мере 8 активных лунок, для "контрольной" группы было включено по меньшей мере 30 активных лунок, и для группы "MPP⁺" было включено по меньшей мере 26 активных лунок ("активный" означает лунки с достаточным количеством электродов, измеряющих электрическую активность). Распределения абсолютных параметров тестировали в отношении нормальности и статистическую значимость между группами оценивали посредством одностороннего ANOVA.

На фиг. 8 приведены некоторые репрезентативные параметры для следующих категорий: характеристики колебаний и синхронность. Эти параметры характеризуют MPP⁺-индуцированные функциональные эффекты при электрической стимуляции и эффективность предупреждения/восстановления, обеспечиваемую наночастицами по изобретению при электрической стимуляции (т.е. способность предупреждать/восстанавливать функциональные эффекты до уровня, сходного с уровнем "контрольной" группы).

Для оценки совокупных эффектов многопараметрические результаты для выборки из 204 параметров проецировали в один параметр, называемый "показателем эффекта". Он представляет собой линейную комбинацию выбранных признаков, преобразующий наборы данных в вектор, где "контрольная" группа, подвергнутая воздействию электрического поля, имела среднюю величину "0", и группа "MPP⁺", подвергнутая воздействию электрического поля, имела среднюю величину "1". Вычисление Z-фактора показателя эффекта проводили посредством выбора 18 из 204 оцениваемых параметров, оптимизированных для поиска наилучшего различия между "контрольной" группой и группой "MPP⁺" (Kummel A, et al., J Biomol Screen., 2010, 15 (1), 95-101: Integration of multiple readouts into the z' factor for assay quality assessment). Анализ показателя эффекта представлен на фиг. 9.

Эффективность наночастиц по изобретению, подвергнутых электрической стимуляции, в отношении предупреждения/восстановления представлена в табл. 4.

Таблица 4

Обобщение показателя эффекта и эффективности наночастиц по изобретению, подвергнутых воздействию электрического поля, в отношении предупреждения/восстановления, определенных для MPP⁺-индуцированной нейрональной сети, подвергнутой воздействию только электрического поля

Группа	Показатель эффекта	Эффективность предупреждения/восстановления	Описание эффектов
"контрольная" группа	0	Эталон (взят за 100%)	—
Группа "MPP ⁺ "	1	0%	—
Группа "наночастиц": биосовместимые золотые наночастицы согласно примеру 1	0,43	56%	Предупреждение 2/3 эффектов MPP ⁺
Группа "наночастиц": биосовместимые золотые частицы согласно примеру 2	0,72	28%	Предупреждение 1/3 эффектов MPP ⁺
Группа "наночастиц": биосовместимые кремниевые наночастицы согласно примеру 5	0,65	35%	Предупреждение 1/3 эффектов MPP ⁺
Группа "наночастиц": биосовместимые частицы титаната бария согласно примеру 6	0,64	36%	Предупреждение 1/3 эффектов MPP ⁺

Лечение симптомов болезни Паркинсона посредством DBS одобрено FDA с 2002 года. Наиболее часто используемыми параметрами стимуляции, пригодными в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами, являются: частота от 130 до 185 Гц, длительность импульса от 60 до 210 мс и амплитуда напряжения от 1 до 3,5 В. В описанных в настоящем описании экспериментах стимуляцию проводили на сокультуре нейрональных сетей в течение 30 мин со стимулом=10 двухфазных импульсов (длительность импульса=100 мкс), амплитудой импульса=±500 мВ, частотой импульса=20 Гц и периодом последовательностей импульсов=0,2 Гц.

На фиг. 12, 13 и в табл. 4 показано, что предварительная обработка нейрональной сети наночастицами по изобретению и воздействием электрического поля предупреждает/восстанавливает индуцированные MPP⁺ функциональные эффекты под действием на нейрональную сеть электрического поля. Интересно, что эффективность предупреждения/восстановления наблюдают для параметров в категориях, связанных с характеристиками колебаний и синхронностью, и она может достигать уровня вплоть до уровня, наблюдаемого в "контрольной" группе. Эти характеристики колебаний и параметры синхронизации обычно подвергают мониторингу в качестве показателя измененного развития сети. Эти параметры преимущественно могут восстанавливаться в присутствии наночастиц по изобретению, подвергнутых электрической стимуляции.

Эти результаты подчеркивают преимущественную эффективность наночастиц, описанных в настоящей заявке, под действием электрического поля, в отношении восстановления индуцированных MPP⁺ функциональных эффектов под действием электрического поля на нейрональную сеть.

Пример 8. Оценка эффектов наночастиц согласно примерам 2, 3, 4 и 5, подвергнутых воздействию электрической стимуляции, на индуцируемые амилоидом бета 1-42 функциональные эффекты в отношении первичных нейрональных сетей мыши с использованием технологии фенотипического скрининга с МЕА.

Эффективность наночастиц по изобретению, подвергнутых электрической стимуляции, в отношении восстановления тестировали *in vitro* с использованием МЕА в модели индуцируемой амилоидом бета 1-42 (Abeta 1-42) болезни Альцгеймера, в культурах нейронов лобной коры мыши.

Для индукции связанного с болезнью Альцгеймера функционального фенотипа, синтетические обработанные НИР (гексафторизопропанол) пептиды Abeta 1-42 (обработка НИР приводит к образованию мономеров амилоида-бета) используют в субтоксической дозе (100 нМ). Высокие уровни амилоида-бета (Abeta) снижают глутаматергическую синаптическую передачу и вызывают потерю синапсов (Palop et al., Nat Neurosci., 2010, 13(7), 812-818: Amyloid-beta induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks; Hsia et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 1999, 96, 3228-3233: Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models). Образование Abeta и его секреция во внеклеточное пространство строго регулируется нейрональной активностью *in vitro* и *in vivo*. Увеличенная нейрональная активность усиливает продукцию Abeta, и блокирование нейрональной активности имеет противоположный эффект. Эта синаптическая регуляция Abeta опосредуется, по меньшей мере частично, клатрин-зависимым эндоцитозом поверхностного белка-предшественника амилоида (APP) в пресинаптических окончаниях, эндосомальным протеолитическим расщеплением APP и высвобождением Abeta в синаптических окончаниях (Cirrito et al., Neuron, 2005, 48, 913-922: Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels *in vivo*).

Материалы и способы.

Первичная культура клеток.

Ткань лобной коры извлекали из мышей chr:NMRI на сутки 15/16 эмбрионального развития (Charles River). Мышей умерщвляли смещением позвонков. Ткань диссоциировали расщеплением ферментами (133,3 единиц Кунитца/мл ДНКазы; 10 единиц/мл папаина) и механическим растиранием, подвергали подсчету, контролю жизнеспособности и высевали в 20-мкл каплю DMEM, содержащую ламинин (10 мкг/мл), 10% эмбриональную телячью сыворотку и 10% сыворотку лошади в МЕА. Культуры в МЕА инкубировали при 37°C в атмосфере 10% CO₂ до тех пор, пока они не становились готовыми для применения. Культуральную среду восполняли два раза в неделю посредством DMEM, содержащей 10% сыворотку лошади. Развивающиеся сокультуры обрабатывали ингибиторами митоза 5-фтор-2'-дезоксифлуридином (25 мкМ) и уридином (63 мкМ) на 5 сутки после посева для предупреждения дальнейшей глиальной пролиферации.

В группах "наночастиц" лунки сначала обрабатывали Abeta 1-42 (синтетические обработанные НИР пептиды амилоида-бета 1-42) в момент времени T₀ (T₀ представляет собой конец периода культивирования *in vitro* в течение 28 суток). Затем лунки обрабатывали в момент времени T₀+4 ч суспензией наночастиц из примеров 2, 3, 4 и 5 (причем каждая суспензия имеет концентрацию 800 мкМ) в независимых и параллельных экспериментах. В "контрольной" группе в лунки добавляли воду в момент времени T₀, а затем в момент времени T₀+4 ч. В группе "Abeta" Abeta 1-42 добавляли в лунки в момент времени T₀, а затем в лунки добавляли воду в момент времени T₀+4 ч.

Нейрональную активность регистрировали следующим образом:

В момент времени T₀ перед добавлением Abeta 1-42 (или воды в "контрольной группе")

В момент времени T₀ + 1 ч, T₀ + 2 ч, T₀ + 3 ч, T₀ + 4 ч (перед добавлением наночастиц в группе "наночастиц" или "воды" в контрольной группе), T₀+5 ч и T₀+6 ч.

Величины получали из сгруппированных данных по 60 с, полученных за период 30 мин после стабилизации активности в течение 30 мин.

После регистрации в момент времени T₀+6 ч, все лунки активировали посредством одного из активных электродов с помощью электрических стимулов. Стимуляцию проводили в течение 30 мин (стимуляция 1 электрода на лунку в 48 лунках МЕА, минимальная длительность стимуляции=100 мкс, устранение артефактов - 2 мс на импульс, импульс 10х двухфазный ±500 мВ). Ответ не стимулирующих электродов усредняли и приводили к активности до стимуляции (фиг. 10).

Нейрочипы микроэлектродных матриц.

Нейрочипы 48-луночных микроэлектродных матриц приобретали от Axion Biosystems Inc. Эти чипы имеют 16 пассивных электродов на лунку. Поверхность закрывали на 1 час полиэтиленмином (PEI, 50% в боратном буфере), промывали и сушили воздухом.

Многоканальная регистрация и многопараметрический анализ данных.

Для регистрации использовали многоканальную систему регистрации MAESTRO от Axion Biosystems (США). Для внеклеточной регистрации 48-луночные МЕА устанавливали в регистрирующую станцию MAESTRO и поддерживали при 37°C. Регистрацию проводили в DMEM/10% инактивированной

нагреванием сыворотке лошади. Значение pH поддерживали при 7,4 с непрерывным потоком фильтрованного увлажненного воздуха с 10% CO₂. Потенциалы действия (или "спайки") регистрировали в виде последовательностей пиковых потенциалов и кластеризовали в так называемые "разряды". Разряды количественно описывали посредством прямого анализа последовательностей пиковых потенциалов с использованием программ Spike Wrangler и NPWaveX (both NeuroProof GmbH, Rostock, Германия). Разряды определялись началом и концом коротких событий пиковых потенциалов (фиг. 7).

С использованием одновременного многопараметрического анализа паттернов активности сети было получено 204 описывающих активность параметра последовательностей пиковых потенциалов. Эти параметры позволяют получить точное описание изменений активности в следующих четырех категориях: общая активность, структура разряда, характеристики колебаний и синхронность.

Функциональные эффекты амилоида бета 1-42 на нейрональную сеть, подвергнутую электрической стимуляции, и эффективность наночастиц по изобретению в отношении восстановления при электрической стимуляции оценивали с помощью описанных выше параметров (также некоторые из них повторены в табл. 5 ниже).

Таблица 5

Описывающие активность параметры из многопараметрического анализа данных в четырех следующих категориях: общая активность, структура разряда, характеристики колебаний и синхронность

Общая активность	Контраст потенциала действия	Описывает возникновение или отсутствие потенциалов действия в соседние временные сегменты последовательности потенциалов действия, отражающее вариабельности генерируемости разрядов элементов в пределах экспериментальных эпизодов
Структура разряда	Суммарная длительность разряда	Средняя длительность разрядов (мс)
Характеристики и колебаний	SD частоты разряда	Стандартное отклонение количества разрядов в минуту, указывающее на вариабельности генерируемости разрядов элементов в пределах экспериментальных эпизодов
	SD периода разряда	Стандартное отклонение периода разряда, отражающее варьирование расстояний в отдельных элементах между последовательными разрядами в пределах экспериментальных эпизодов. Низкие величины отражают более высокую регулярность структуры разряда
Синхронность	CVnet частоты потенциала действия разряда	CVnet частоты потенциала действия разряда, отражающая варьирование потенциалов действия в интервалах разрядов в пределах экспериментальных эпизодов на протяжении всей сети. Снижение этого параметра отражает

		увеличение повышение синхронизации в пределах сети
	CVnet контраста потенциала действия	CVnet контраста потенциала действия. Более высокие величины указывают на более высокую вариабельность "генерируемости импульсов" элементов в сети

Активность сети при стимуляции приводили к связанной с ней спонтанной нативной активности (регистрация в момент T0+6 ч), взятой за 100% для каждого эксперимента. Величины, связанные со спонтанной нативной активностью, были получены из сгруппированных данных по 60 с, полученных за период 30 мин после стабилизации активности в течение 30 мин. Результаты (величины параметров) выражали в качестве среднего значения \pm SEM для независимых сетей. Для каждой группы "наночастиц" в анализ было включено по меньшей мере 9 активных лунок, для "контрольной" группы в анализ было включено по меньшей мере 18 активных лунок, и для группы "Abeta" в анализ было включено по меньшей мере 18 активных лунок ("активный" означает лунки с достаточным количеством электродов, измеряющих электрическую активность). Распределения абсолютных параметров тестировали в отношении нормальности и статистическую значимость между группами оценивали посредством одностороннего ANOVA.

На фиг. 11 представлены некоторые репрезентативные параметры из следующих категорий: общая активность, структура разряда, характеристики колебаний и синхронность.

Эти параметры охарактеризовывают индуцируемые Abeta 1-42 функциональные эффекты при электрической стимуляции и эффективность восстановления, обеспечиваемую наночастицами по изобретению, при электрической стимуляции (т.е. способность предупреждать/восстанавливать функциональные эффекты на уровне, сходном с уровнем в "контрольной группе").

Для оценки совокупных эффектов многопараметрические результаты для выборки из 204 параметров проецировали в один параметр, называемый "показателем эффекта". Он представляет собой линейную комбинацию выбранных признаков, преобразующий наборы данных в вектор, где "контрольная" группа, подвергнутая воздействию электрического поля, имела среднюю величину "0", и группа "Abeta", подвергнутая воздействию электрического поля, имела среднюю величину "1". Вычисление Z-фактора показателя эффекта проводили посредством выбора 15 из 204 оцениваемых параметров, оптимизированных для поиска наилучшего различия между "контрольной" группой и группой "Abeta" (Kummel A, et al., J Biomol Screen., 2010, 15 (1), 95-101: Integration of multiple readouts into the z'factor for assay quality assessment). Анализ показателя эффекта представлен на фиг. 12.

Эффективность наночастиц по изобретению, подвергнутых электрической стимуляции, в отношении восстановления, представлена в табл. 6.

Таблица 6

Обобщение показателя эффекта и эффективности наночастиц по изобретению, подвергнутых воздействию электрического поля, в отношении восстановления, определенных для индуцированных Abeta 1-42 эффектов на нейрональную сеть, подвергнутую воздействию только электрического поля

Группа	Показатель эффекта	Эффективность восстановления	Описание эффектов
"контрольная" группа	0	Эталон (взят за 100%)	—
Группа "Abeta"	1	0%	—
Группа "наночастиц": биосовместимые золотые частицы согласно примеру 2	0,43	25%	Предупреждение 1/4 эффектов Abeta 1-42
Группа "наночастиц": биосовместимые частицы оксида	0,72	45%	Предупреждение 1/2 эффектов Abeta 1-42

циркония согласно примеру 3			
Группа "наночастиц": биосовместимые наночастицы оксида циркония из примера 4	0,65	34%	Предупреждение 1/3 эффектов Abeta 1-42
Группа "наночастиц": биосовместимые кремниевые наночастицы согласно примеру 5	0,64	34%	Предупреждение 1/3 эффектов Abeta 1-42

Продолжаются клинические исследования для оценки потенциала DBS для лечения болезни Альцгеймера. Параметрами стимуляции, обычно применимыми в контексте изобретения в комбинации с описанными в настоящем описании наночастицами, являются: частота 130 Гц, длительность импульса 60 или 90 мкс, амплитуда напряжения от 3 до 5 В. В описанных в настоящем описании экспериментах стимуляцию проводили на сокультуре нейрональных сетей в течение 30 мин, где стимул=10 двухфазных импульсов, минимальная длительность импульса=100 мкс, амплитуда импульса= ± 50 0 мВ, частота импульса=20 гц, и период последовательности импульсов=0,2 Гц.

На фиг. 11 и 12 и в табл. 6 показано, что обработка нейрональной сети наночастицами по изобретению под действием электрического поля восстанавливает индуцированные Abeta 1-42 функциональные эффекты в нейрональной сети под действием электрического поля. Интересно, что эффективность восстановления наблюдается для параметров в категориях, связанных с характеристиками колебаний и синхронностью, и она может достигнуть уровня вплоть до уровня, наблюдаемого в "контрольной" группе.

Мониторинг характеристик колебаний и параметров синхронности обычно проводят в качестве показателя измененного развития сети. Эти параметры могут преимущественно восстанавливаться в присутствии наночастиц по изобретению, подвергнутых электрической стимуляции.

Эти результаты подчеркивают преимущественные характеристики наночастиц, описанных в настоящем описании, под действием электрического поля в отношении восстановления индуцированных Abeta 1-42 функциональных эффектов в нейрональной сети под действием электрического поля.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение наночастицы или агрегата наночастиц для предупреждения или лечения неврологического заболевания или по меньшей мере одного его симптома у индивидуума, когда наночастицу или агрегат наночастиц подвергают воздействию электрического поля, где материал наночастиц или агрегата наночастиц выбран из проводникового материала, выбранного из металла, имеющего стандартный потенциал восстановления E° выше 0,2, который представляет собой Ir, Pd, Pt, Au или их смеси, и органического материала, имеющего смежные sp²-гибридизованные углеродные центры в его структуре, где данный органический материал состоит из полианилина, полипиррола, полиацетилена, политиофена, поликарбазола и/или полипирена, полупроводникового материала с E_g запрещенной зоны ниже 3,0 эВ, выбранного из элемента из группы IVA периодической таблицы Менделеева, который выбран из кремния (Si) и германия (Ge), смешанной композиции элементов группы III и V периодической таблицы Менделеева, смешанной композиции элементов из группы II и VI периодической таблицы Менделеева, изолирующего материала с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 200 или выше, который представляет собой смешанный оксид металла, выбранный из BaTiO₃, KTaNbO₃, KTaO₃, SrTiO₃ и BaSrTiO₃, и изолирующего материала с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже, который представляет собой диэлектрический материал, выбранный из оксида металла, смешанного оксида металла, в которых элемент - металл представляет собой металл из периода 3, 5 или 6 периодической таблицы Менделеева или лантанид, и углеродного материала, причем диэлектрическую постоянную ϵ_{ijk} определяют при температуре от 20°C до 30°C и при частоте от 10² Гц вплоть до инфракрасной частоты, и где электрическое поле применяют

посредством глубокой стимуляции головного мозга, транскраниальной электрической стимуляции или транскраниальной магнитной стимуляции.

2. Применение по п.1, где материал наночастицы или агрегата наночастиц состоит из элемента группы IVA периодической таблицы Менделеева, который выбран из кремния (Si) и германия (Ge) и имеет примеси заряженного носителя, выбранного из Al, B, Ga, In и P.

3. Применение по п.1 или 2, где изолирующий материал с E_g запрещенной зоны 3,0 эВ или выше и диэлектрической постоянной ϵ_{ijk} , равной 100 или ниже, выбран из выбран из Al_2O_3 , $LaAlO_3$, La_2O_3 , CeO_2 , SiO_2 , SnO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 , HfO_2 , Y_2O_3 и черного технического алмаза.

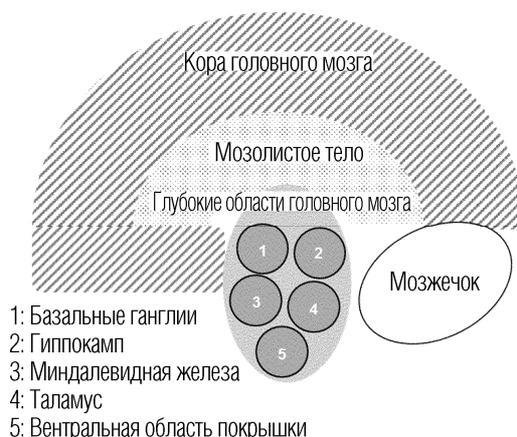
4. Применение по любому из пп.1-3, где наночастица или агрегат наночастиц покрыты биосовместимым материалом, который представляет собой средство, сообщаемое отрицательный заряд поверхности наночастицы или агрегата наночастиц.

5. Применение по п.4, где средство, сообщаемое отрицательный заряд поверхности наночастицы или агрегата наночастиц, выбрано из фосфата, карбоксилата и сульфата.

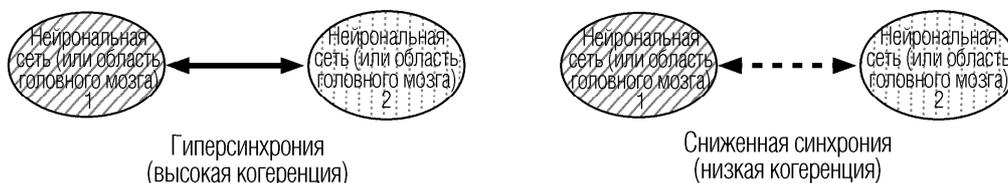
6. Применение по любому из пп.1-5, где наночастица или агрегат наночастиц является гидрофильной с нейтральным поверхностным зарядом, или покрыта биосовместимым материалом, выбранным из гидрофильного средства, сообщаемого нейтральный заряд поверхности наночастицы.

7. Применение по п.6, где гидрофильное средство, сообщаемое нейтральный заряд поверхности наночастицы, представляет собой средство, экспонирующее функциональную группу, выбранную из спирта (R-OH), альдегида (R-COH), кетона (R-CO-R), сложного эфира (R-COOR), кислоты (R-COOH), тиола (R-SH), сахара, ангидрида (RCOOOC-R) и пиррола.

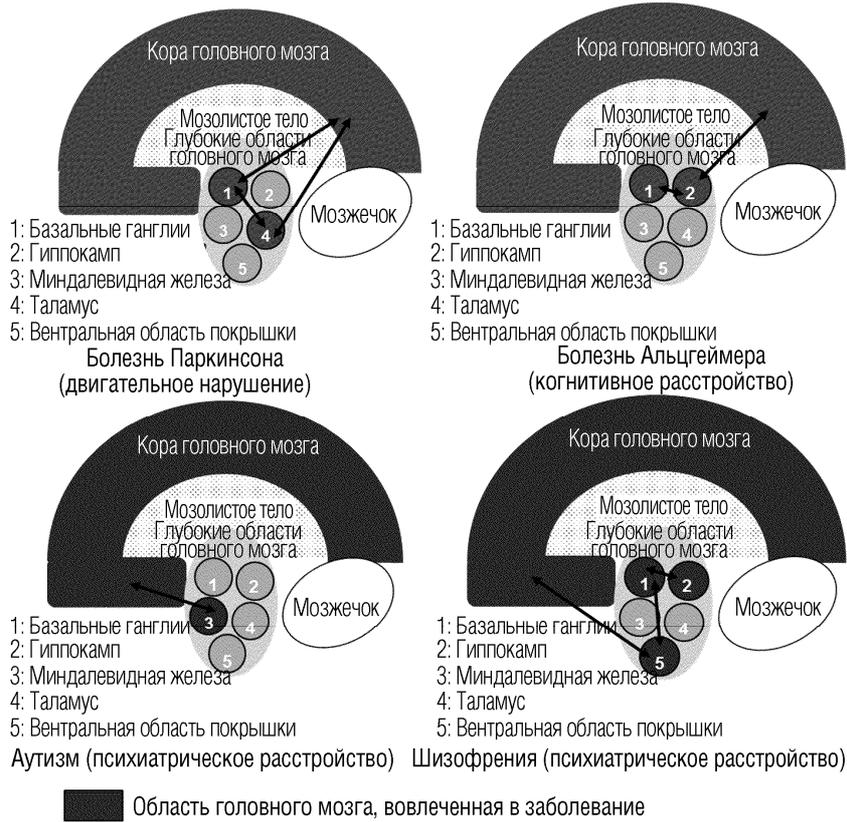
8. Применение по любому из пп.1-7, где неврологическое заболевание выбрано из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, эпилепсии, обсессивно-компульсивного расстройства, расстройства аутистического спектра, депрессивного расстройства, дистонии, синдрома Туретта, шизофрении, инсульта, афазии, деменции, тиннитуса, болезни Гентингтона, эссенциального тремора, биполярного расстройства, тревожного расстройства, обусловленного пристрастием расстройства, вегетативного состояния сознания и по меньшей мере одного их симптома.



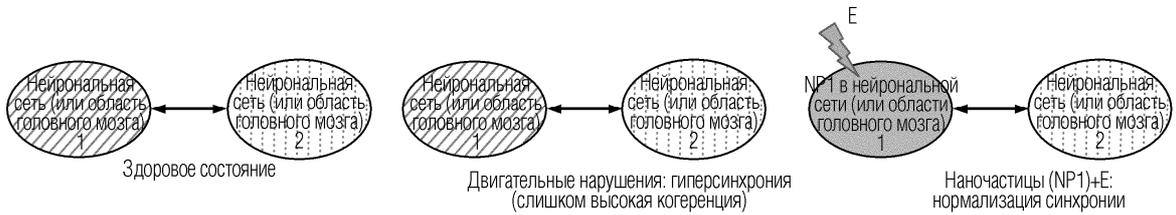
Фиг. 1



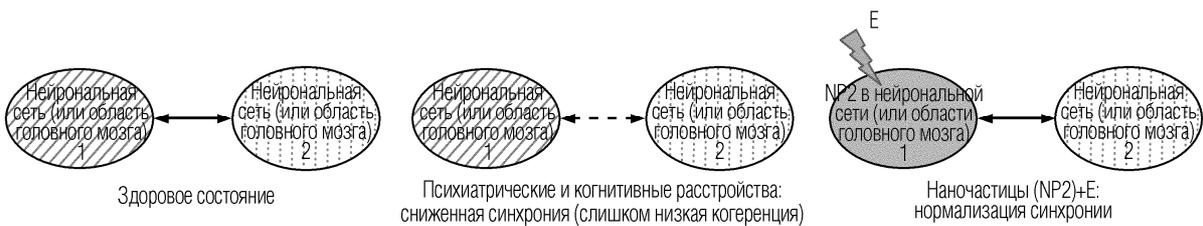
Фиг. 2



Фиг. 3



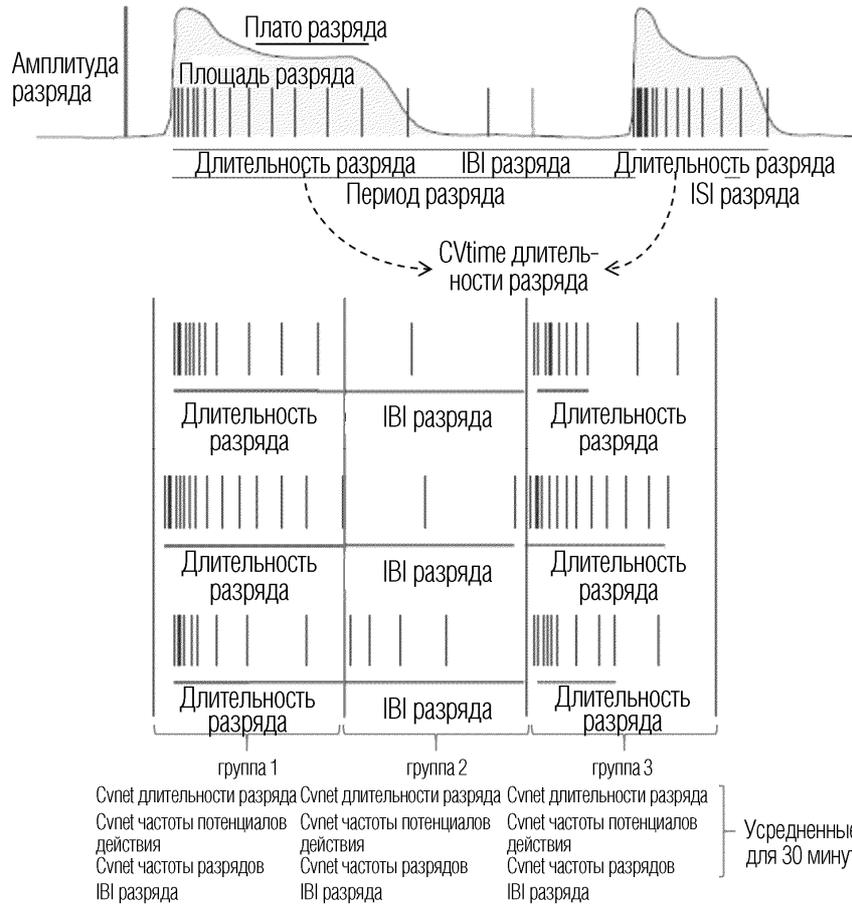
Фиг. 4



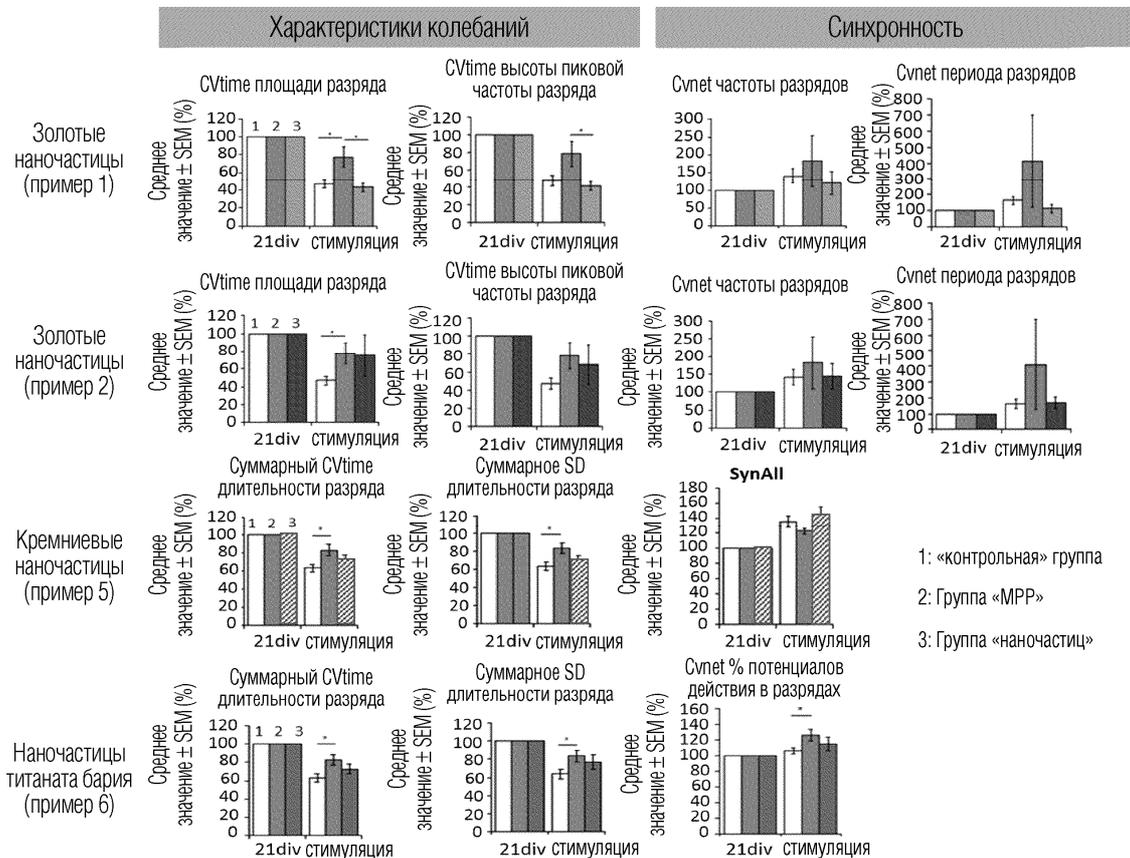
Фиг. 5



Фиг. 6

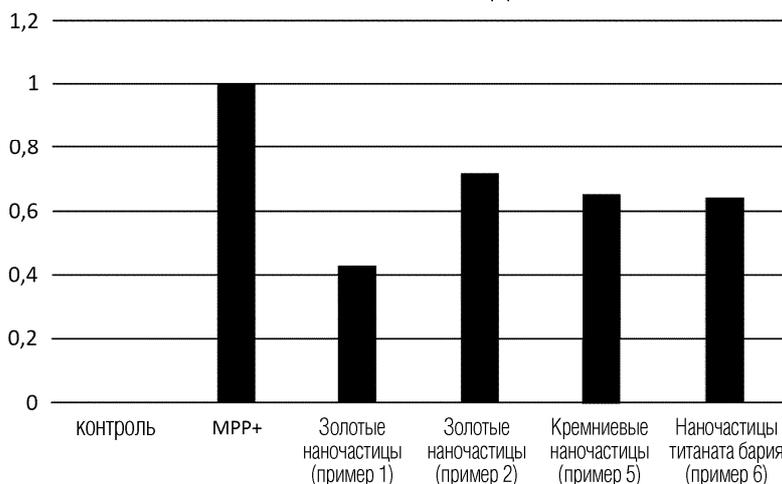


Фиг. 7

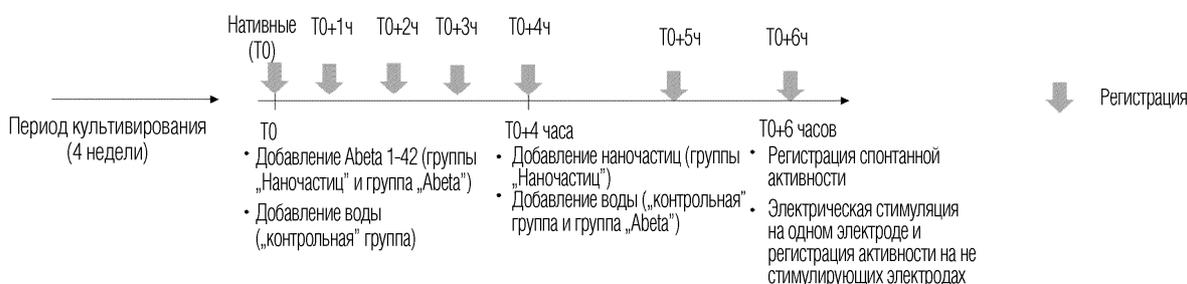


Фиг. 8

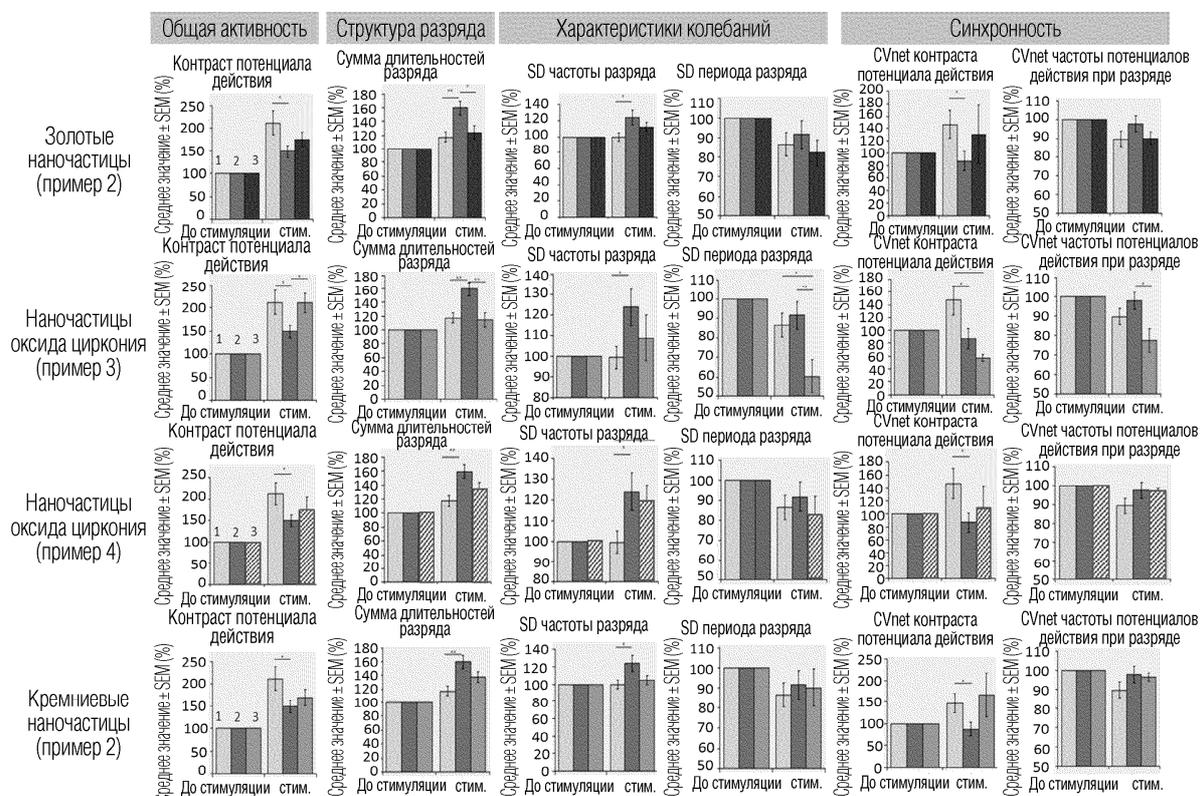
Анализ показателя эффекта



Фиг. 9

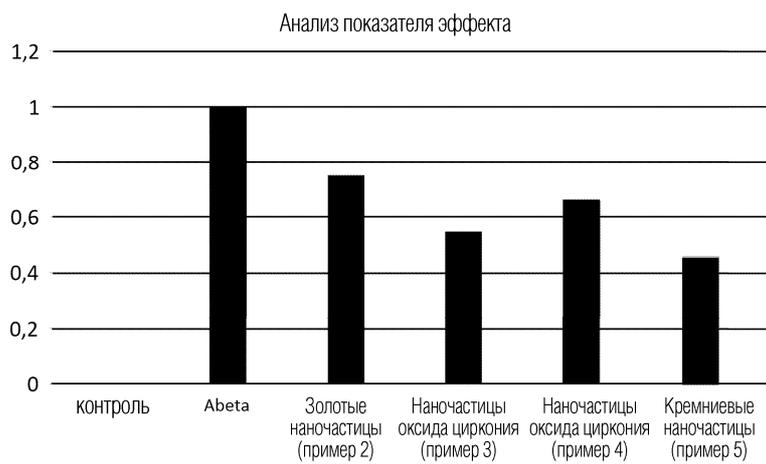


Фиг. 10



1: «контрольная» группа; 2: Группа «Abeta 1-42»; 3: Группа «наночастиц»

Фиг. 11



Фиг. 12

