(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105267235 A
(43)申请公布日 2016.01.27

(21)申请号 201510419242.9

(22)申请日 2015.07.16

(30)优先权数据
62/025,176 2014.07.16 US

(71)申请人 华上生技医药股份有限公司
地址 中国台湾台北市内湖区瑞光路258巷52号1层

(72)发明人 杨滢臻 陈嘉南 纪俐伶

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
代理人 江葳

(51)Int.Cl.
A61K 33/24(2006.01)
A61K 33/38(2006.01)
A61K 33/06(2006.01)
A61K 33/34(2006.01)
A61K 9/14(2006.01)
A61L 29/02(2006.01)
A61P 25/02(2006.01)
A61P 21/04(2006.01)
A61P 19/08(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 25/08(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)

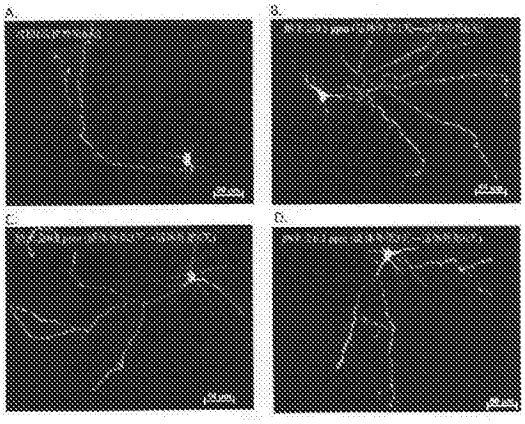
权利要求书2页 说明书13页 附图14页

(54)发明名称

纳米金属在促进神经突生长和治疗和/或预防神经病症中的用途

(57)摘要

本发明涉及一种使用金属纳米粒子来促进神经突生长并且治疗和/或预防神经病症的用途。确切地说,本发明的用途是使用金纳米粒子来促进神经突生长并且治疗和/或预防神经病症。



CN 105267235 A

1. 一种金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途，所述组合物、试剂盒或医疗装置用于改进个体的神经元的神经突生长 (neurite outgrowth)。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述金属纳米粒子或金属粒子选自由银纳米粒子或银粒子、金纳米粒子或金粒子、铂纳米粒子或铂粒子、钯纳米粒子或钯粒子、铝纳米粒子或铝粒子、镍纳米粒子或镍粒子、钴纳米粒子或钴粒子、铜纳米粒子或铜粒子以及其组合组成的群组。

3. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述金属纳米粒子或金属粒子是金纳米粒子或金粒子。

4. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述金属纳米粒子的尺寸在 1nm 与 1000nm 之间。

5. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述金属纳米粒子或金属粒子与穿过血脑屏障的靶向剂组合。

6. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述组合物、试剂盒或医疗装置可以任选地包含与所述金属纳米粒子或金属粒子组合（和 / 或结合）的第二治疗剂。

7. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述神经元是受损神经元。

8. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述神经突生长是关于轴突和 / 或树突生长。

9. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述神经突是活体内或活体外神经突。

10. 根据权利要求 1 所述的用途，其中个体是人类。

11. 根据权利要求 1 所述的用途，其中所述神经元形成神经移植物或神经移植体的一部分。

12. 一种金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途，所述组合物、试剂盒或医疗装置用于治疗和 / 或预防个体的神经病症的用途。

13. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述金属纳米粒子或金属粒子选自由银纳米粒子或银粒子、金纳米粒子或金粒子、铂纳米粒子或铂粒子、钯纳米粒子或钯粒子、铝纳米粒子或铝粒子、镍纳米粒子或镍粒子、钴纳米粒子或钴粒子、铜纳米粒子或铜粒子以及其组合组成的群组。

14. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述金属纳米粒子或金属粒子是金纳米粒子或金粒子。

15. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述金属纳米粒子的尺寸在 1nm 与 1000nm、优选地 1nm 到 400nm 之间。

16. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述金属纳米粒子或金属粒子可以通过直接接触、经口投与、吸入、皮下投与 (S.C.)、静脉内投与 (I.V.)、腹膜内投与 (I.P.)、肌肉内投与 (I.M.)、鼻内、鞘内注射、局部施加或局部投与来投与。

17. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述组合物、试剂盒或医疗装置可以任选地包含与所述金属纳米粒子或金属粒子组合的第二治疗剂。

18. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述个体是哺乳动物。

19. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述个体是人类。

20. 根据权利要求 12 所述的用途，其中所述神经病症是多发性硬化症、坐骨神经缺陷、

神经系统损伤、肌肉萎缩性侧索硬化 ALS ;三叉神经痛 ;舌咽神经痛 ;贝尔氏麻痹 ;重症肌无力 ;肌肉萎缩症 ;进行性肌肉萎缩 ;原发性侧索硬化 PLS ;假性延髓麻痹 ;进行性延髓麻痹、脊髓性肌肉萎缩 ;进行性延髓麻痹 ;遗传性肌肉萎缩 ;无脊椎盘综合征（例如，成疝、破裂以及脱垂盘综合征）;颈椎病 ;丛病症 ;胸廓出口毁坏综合征 ;外周神经病 ;卟啉症 ;轻度认知障碍 ;阿尔茨海默氏病 ;亨廷顿氏病 ;帕金森氏病 ;帕金森叠加综合征（例如，多发性系统萎缩症、进行性核上麻痹以及皮质基底核变性症）;路易体痴呆 ;额颞叶痴呆 ;脱髓鞘疾病（例如，吉兰 - 巴雷综合征和多发性硬化症）;恰克 - 马利 - 杜斯氏疾病 (CMT ;也称为遗传性运动和感觉神经病 HMSN、遗传性感觉运动神经病 HSMN 以及腓骨肌萎缩症）;朊病毒病（例如，克雅二氏症、格 - 斯二氏综合征 GSS、致命性家族性失眠症 FFI 以及牛海绵状脑病 (BSE，其通常称为疯牛病））;皮克氏病 ;癫痫症 ;AIDS 痴呆综合征（也称为 HIV 痴呆、HIV 脑病以及 HIV 相关痴呆）;由糖尿病、癌症、AIDS、肝炎、肾脏功能障碍、科罗拉多壁虱热、白喉、HIV 感染、麻疯病、莱姆病、结节性多动脉炎、类风湿性关节炎、结节病、休格连综合征、梅毒、全身性红斑性狼疮症或淀粉样变性病导致的周边神经病和神经痛 ;由物理损伤（与例如烧伤、创伤、手术以及事故相关）、局部缺血、长时间暴露于低温（例如，冻伤）导致的周边神经损伤以及由于例如中风或颅内出血（例如脑出血）造成的中枢神经系统损伤。

21. 一种组合物、试剂盒或医疗装置，其包含足以治疗和 / 或预防神经病症的量的金属纳米粒子或金属粒子。

纳米金属在促进神经突生长和治疗和/或预防神经病症中的用途

技术领域

本发明涉及一种使用金属纳米粒子来促进神经突生长并且治疗和/或预防神经病症的方法。确切地说，本发明的方法使用金纳米粒子来促进神经突生长并且治疗和/或预防神经病症。

背景技术

神经病症包括急性脑或脊髓损伤（例如中风）和慢性衰老以及若干神经变性病症，例如阿尔茨海默氏病(Alzheimer′ s disease)、帕金森氏病(Parkinson′ s disease)和亨廷顿氏病(Huntington′ s disease)。神经变性涉及神经元的结构或功能的进行性损失，包括神经元死亡。许多神经变性疾病是由于神经变性过程而出现。目前，不存在针对神经变性疾病提供神经元功能保护或恢复的有效疗法。许多通过输注神经营养因子提供所述益处的临床努力均已失败，尽管其在临床前评估中取得稳固作用。这些失败的一个重要原因是由于血脑屏障扩散限制而导致的难以以足够量将这些蛋白质分子提供到中枢神经系统中的预期细胞标靶。迫切需要研发新颖的促进轴突再生反应的治疗途径，在所述途径中轴突能够再生、到达其标靶并且恢复功能。

由于其独特的光学、电以及催化性质，金属纳米粒子已经受到深入研究。为了利用并且优化纳米尺寸金属粒子的化学和物理性质，大范围的研究已经集中到控制尺寸和形状上，其在调节所述金属粒子的性质中是至关重要的。实践若干途径来合成金属纳米粒子，所述途径例如UV照射、激光烧蚀、气溶胶技术、平版印刷术、超声波场以及光化学还原技术。US 20100068240公开了可植入神经再生导管主要包含可生物降解聚合物和金属，其中纳米金用于增强所述导管的物理强度或通过增加从神经胶质细胞释放的BDNF和GDNF量来促进神经再生。然而，用于US 20100068240的纳米金属是用以增强可植入导管的强度并且以高浓度刺激神经胶质细胞以释放BDNF和GDNF；然而，这一在先技术参考既不教授也不表明通过金属纳米粒子自身直接增加神经元生长并且治疗神经病症。姜胜文(Seungmoon Jung)等人公开了细胞内金纳米粒子增加兴奋性并且使其恶化，然而所述参考显示细胞内AuNP在病理条件下导致异常的放电模式并且使癫痫 活动恶化，因此表明一种可能，即细胞内AuNP可能导致大脑中的神经元功能障碍或损伤或使其恶化（姜胜文等人，公共科学图书馆·综合(PLOS ONE)，第9卷，第3期，e91360)。

因此，仍需要研发促进神经元生长(growth/outgrowth)以及治疗和/或预防神经病症的途径。

发明内容

本发明提供一种金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途，所述组合物、试剂盒或医疗装置用于改进个体的神经元的神经突生长(neurite outgrowth)。在一个实施例中，金属纳米粒子或金属粒子选自由

银纳米粒子或银粒子、金纳米粒子或金粒子、铂纳米粒子或铂粒子、钯纳米粒子或钯粒子、铝纳米粒子或铝粒子、镍纳米粒子或镍粒子、钴纳米粒子或钴粒子、铜纳米粒子或铜粒子以及其组合所组成的群组。

本发明还提供一种金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途，所述组合物、试剂盒或医疗装置用于治疗和/或预防个体的神经病症的用途。

在另一个实施例中，金属纳米粒子可以通过直接接触、经口投与、吸入、皮下投与(S.C.)、静脉内投与(I.V.)、腹膜内投与(I.P.)、肌肉内投与(I.M.)、鞘内注射、鼻内、局部(topical)施加或局部(localized)投与来投与。

在另一实施例中，金属纳米粒子或金属粒子与穿过血脑屏障的靶向剂组合。

在另一实施例中，神经病症是多发性硬化症、坐骨神经缺陷、神经系统损伤、肌肉萎缩性侧索硬化(ALS)；三叉神经痛；舌咽神经痛；贝尔氏麻痹(Bell′ s Palsy)；重症肌无力；肌肉萎缩症；进行性肌肉萎缩；原发性侧索硬化(PLS)；假性延髓麻痹；进行性延髓麻痹、脊髓性肌肉萎缩；进行性延髓麻痹；遗传性肌肉萎缩；无脊椎盘综合征(例如，成疝、破裂以及脱垂盘综合征)；颈椎病；丛病症；胸廓出口毁坏综合征；外周神经病；卟啉症、轻度认知障碍；阿尔茨海默氏病；亨廷顿氏病；帕金森氏病；帕金森叠加综合征(Parkinson-plus syndrome)(例如，多发性系统萎缩症、进行性核上麻痹以及皮质基底核变性症)；路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)；额颞叶痴呆；脱髓鞘疾病(例如，吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome)和多发性硬化症)；恰克-马利-杜斯氏疾病(Charcot-Marie-Tooth disease)(CMT；也称为遗传性运动和感觉神经病(HMSN)；遗传性感觉运动神经病(HSMN)以及腓骨肌萎缩症(Peroneal Muscular Atrophy))；朊病毒病(例 如，克雅二氏症(Creutzfeldt-Jakob disease)、格-斯二氏综合征(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome,GSS)、致命性家族性失眠症(FFI)以及牛海绵状脑病(BSE,其通常称为疯牛病))；皮克氏病(Pick′ s disease)；癫痫症；AIDS痴呆综合征(也称为HIV痴呆、HIV脑病以及HIV相关痴呆)；由糖尿病、癌症、AIDS、肝炎、肾脏功能障碍、科罗拉多壁虱热(Colorado tick fever)、白喉、HIV感染、麻疯病、莱姆病(lyme disease)、结节性多动脉炎、类风湿性关节炎、结节病、休格连综合征(sjogren syndrome)、梅毒、全身性红斑性狼疮症或淀粉样变性病导致的周边神经病和神经痛；由物理损伤(与例如烧伤、创伤、手术以及事故相关)、局部缺血、长时间暴露于低温(例如，冻伤)导致的周边神经损伤以及由于例如中风或颅内出血(例如脑出血)造成的中枢神经系统损伤。

本发明还提供一种医疗装置，其以足以治疗和/或预防神经病症的量包含金属纳米粒子或金属粒子。本发明还提供一种含有有效量的金属纳米粒子或金属粒子的医疗装置用于治疗和/或预防神经病症的用途。

附图说明

图1A到D显示在不同天数的使用0ppm和0.5ppm纳米粒子的神经突生长分析的免疫荧光染色结果(A：对照组；图1B到1D：分别关于在第一天(DIV 1)、第二天(DIV2)以及第三天(DIV3)的经金纳米粒子处理的神经元)。

图2A到D显示使用0(A)、0.1ppm(B)、0.3ppm(C)以及0.5ppm(D)纳米粒子的神经突生

长分析的免疫荧光染色结果。

图 3A 到 F 显示金纳米粒子对处于不同细胞密度下的细胞分化的作用的免疫荧光染色结果 (A :对照组 (DIV6) ;B :5×10^3个细胞 / 毫升 (DIV2--DIV6) ;C :对照组 (DIV6) ;D :3×10^4个细胞 / 毫升 (DIV2--DIV6) ;E :6×10^4个细胞 / 毫升密度 (DIV6) 以及 F :6×10^4个细胞 / 毫升密度 (DIV2--DIV6)。

[0001] 图 4A 到 C 显示划痕测试的结果 (A :对照组 ;B :在 0.3ppm 金纳米粒子处理组中的再生轴突 (绿色) 密度 ;C :在 0.5ppm 金纳米粒子处理组中的再生轴突 (绿色) 的密度)。

[0002] 图 5A 到 C 显示大小为 1nm 至 5nm 的金纳米粒子的划痕测试的结果 (A: 对照组 ; B:0.3ppm 之金纳米粒子及 C:0.5ppm 之金纳米粒子)。

[0003] 图 6A 到 E 显示大小为 1nm 到 20nm 的金纳米粒子的划痕测试的结果 (A :对照组 ; B :0.5ppm 的金纳米粒子 ;C :0.75ppm 的金纳米粒子 ;D :1.0ppm 的金纳米粒子及 E :1.25ppm 的金纳米粒子)。

[0004] 图 7A 到 C 显示 1nm to 5nm 的金纳米粒子的水迷宫分析 (A :试验天数中大鼠的 ; AuNP 组的逃出延迟时间 ;B :在每天的象限中牠们所花的逃出时间及 C :探针试验 (probe trial)7 天后在象限中所花的时间)。

[0005] 图 8A 与 B 显示经本发明的金纳米粒子堆栈成的金粒子的水迷宫分析 (A :试验天数中小鼠的逃出延迟时间 ;B :他们每天所花的逃出时间)。

图 9 显示用金纳米粒子处理的坐骨神经受损小鼠的运动功能显着恢复,而坐骨神经受损对照组仅在四周之后略微恢复。

图 10 显示大鼠横穿梁所需的时间。

具体实施方式

本发明是基于以下发现 :金属纳米粒子或金属粒子可以通过充当神经营养因子以及促进轴突和树突生长来促进神经突生长。鉴于金属纳米粒子或金属粒子可以充当神经营养因子自身的事实,金属纳米粒子可以修复和 / 或治疗和 / 或预防神经病症,例如神经变性疾病和大脑或脊髓损伤。

在一个方面中,本发明提供一种金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途,所述组合物、试剂盒或医疗装置用于改进个体的神经元的神经突生长 (neurite outgrowth)。

在另一方面中,本发明提供一种金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途,所述组合物、试剂盒或医疗装置用于治疗和 / 或预防个体的神经病症的用途。

定义

除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。虽然可以在本发明的实践或测试中使用类似于或等 效于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本文中所提及的所有公开案都以引用的方式并入。

应理解,以上大体描述与以下详细描述两者都是说明性和解释性的,并且不限制所主张的标的物。在本申请中,除非另外确切地陈述,否则单数的使用包括复数,冠词“一个 / 种

(a/an)”意指“至少一个/种(at least one)”并且“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及例如“包括(includes)”和“包括(included)”等其它形式的使用不是限制性的。此外,除非另外确切地陈述,否则例如“组件”或“组件”等术语涵盖包含一个单元的组件或组件和包含一个以上单元的组件或组件两者。

如本文所用,“金属纳米粒子”为由金属元素组成的纳米化结构,其中至少其相之一具有一或多个尺寸(长、宽或厚)为纳米尺寸。本文使用的“金属粒子”为由复数个金属纳米粒子堆栈而成的金属粒子。

如本文所用,“轴突再生”意指新轴突从活神经元细胞体再生(regrowth)、再生(regeneration)或萌发。

如本文所用,“神经病症”意指存在于中枢神经系统或周边神经系统中的神经元的任何生理功能障碍或死亡或由神经胶质细胞功能障碍导致。所述病症的非限制性清单包含多发性硬化症、坐骨神经缺陷、大脑或脊髓损伤、痴呆、额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、朊病毒病、神经元病以及运动神经元病症。“神经元病”是通过运动神经元或感觉神经元的神经元细胞死亡来表征,并且因此神经元病可以再分为运动和感觉神经元病症。

如本文所用,“神经变性疾病”是指神经元的结构或功能的进行性损失或生理变性(包括轴突损失(死亡))。神经变性疾病包括帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病和大脑和脊髓损伤以及中风。

如本文所用,“个体(subject)”、“个体(individual)”或“患者”在本文中可互换地用以指脊椎动物,优选地是哺乳动物,更优选地是人类。哺乳动物包括(但不限于)鼠类、猿猴、人类、农畜、运动动物以及宠物。也涵盖了活体外获得或活体外培养的生物实体的组织、细胞以及其后代。

如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”或“改善”在本文中可互换地使用。这些术语是指用于获得有益或所需结果的途径,所述有益或所需结果包括(但不限于)治疗益处和/或预防益处。治疗益处涉及根除或改善所治疗的潜在病症。此外,通过根除或改善与潜在病症相关的一或多种生理症状以使得在患者中观察到改进而实现治疗益处,但所述病患可能仍然罹患所述潜在病症。为了实现预防益处,金属纳米粒子可 以向处于罹患特定疾病的风险下的患者或向报告疾病的一或多种生理症状的患者投与,即使这一疾病还没有被诊断。治疗包括预防疾病,也就是说在疾病诱发之前通过投与保护性组合物导致所述疾病的临床症状不显现;抑制疾病,也就是说在诱发事件之后但在疾病的临床出现或再现之前通过投与保护性金属纳米粒子导致所述疾病的临床症状不显现;抑制疾病,也就是说在症状首次出现之后通过投与金属纳米粒子阻止临床症状的发展;预防疾病的复发和/或减轻疾病,也就是说在症状首次出现之后通过投与保护性金属纳米粒子导致临床症状的消退。

如本文所用,“促进(promote)”或“增加(increase)”或“促进(promoting)”或“增加(increasing)”在本文中可互换地使用。这些术语是指与未经治疗的细胞(组织或个体)相比在经治疗细胞(组织或个体)中的测量参数的增加。还可以对相同细胞或组织或个体在治疗之前与治疗之后之间进行比较。增加足够大而可以被检测到。在一些实施例中,与未经处理的细胞相比,经处理细胞增加至少是约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、

80％、90％、1 倍、2 倍、3 倍、4 倍或更多。

如本文所用，“抑制 (inhibit)”、“预防 (prevent)”或“减小 (reduce)”或“抑制 (inhibiting)”、“预防 (preventing)”或“减小 (reducing)”在本文中可互换地使用。这些术语是指与未经处理的细胞（组织或个体）相比在经处理细胞（组织或个体）中的测量参数的减小。还可以对相同细胞或组织或个体在治疗之前与治疗之后之间进行比较。减小足够大而可以被检测到。在一些实施例中，与未经处理的细胞相比，经处理细胞减小至少是约 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或被完全抑制。在一些实施例中，与未经处理的细胞相比，测量参数在经处理细胞中不可检测（即被完全抑制）。

如本文所用，术语“神经元”包括神经元和其部分（例如，神经元细胞体、轴突或树突）。术语“神经元”指示神经系统细胞，其包括中央细胞体 (body/soma) 和两种类型的延伸或突出：树突，一般来说大部分神经元信号通过其传输到细胞体；和轴突，一般来说大部分神经元信号通过其从细胞体传输到效应细胞，例如标靶神经元或肌肉。神经元可以将信息从组织和器官输送到中枢神经系统（传入或感觉神经元）中并且将信号从中枢神经系统传输到效应细胞（传出或运动神经元）。其它神经元（特指中间神经元）连接中枢神经系统（大脑和脊柱）内的神经元。可以经受根据本发明的处理或方法的神经元类型的某些具体实例包括小脑颗粒神经元、背根神经节神经元以及皮层神经元。

如本文所用，“神经突”是指从神经元生长出的任何过程。如本文所用的术语神经突涵盖从神经元生长出的所有所述细胞过程（包括轴突与树突两者）。

如本文所用，“神经突生长”是指细胞从神经元生长出的过程，或指包含从神经元 的生长的细胞，其包括（但不限于）神经突的伸长、分枝和 / 或再生。

如本文所用，“治疗有效量”意指足以治疗罹患疾病（例如，神经变性疾病）的个体或缓解与所述疾病相关的症状或并发症的量。

如本文所用，“医药组合物”是指活性剂（例如，睡茄内酯）与载剂（呈惰性或活性，其使得组合物尤其适用于治疗用途）的组合。

如本文所用，“个体”是指人类或非人类动物。

金属纳米粒子和金属粒子

金属纳米粒子为纳米级。纳米金属粒子优选地包括选自由以下各者组成的群组的金属元素：银、金、铂、钯、铝、镍、钴、铜以及其组合。其可以根据所属领域中已知的 UV 照射、激光烧蚀、气溶胶技术、平版印刷术、超声波场以及光化学还原技术来制备。在一个实施例中，金属纳米粒子是根据公开于台湾专利第 I430858 号中的制造系统和方法制备的金属纳米粒子。确切地说，台湾专利第 I430858 号的金属纳米粒子是根据包含以下步骤的工艺来制备：(1) 加工纯度为 99.99％的金属材料以形成厚度低于 0.3μm 的薄金属膜；(2) 将薄金属膜放置在里面有惰性气体的第一闭合容器中的循环传送带中；(3) 使用闭合型循环传送带将薄金属膜输送到等离子体烧蚀腔室中以进行微波加热和烧结以便将其熔融并且产生纳米金属粒子；(d) 使用循环传送带将纳米金属粒子输送到第二闭合容器中，并且通过冷却处理器冷却粒子以形成呈液态的悬浮液；以及 (e) 收集悬浮的纳米金属粒子以获得所需的高纯度纳米粒子金属。

用于本发明的金属纳米粒子的尺寸可以在约 1nm 与约 1000nm，优选地约 1nm 到约 400nm；优选地，约 1nm 到约 350nm、约 1nm 到约 300nm、约 1nm 到约 250nm、约 1nm 到约 200nm、

约 1nm 到约 100nm、约 1nm 到约 50nm、约 1nm 到约 30nm、约 1nm 到约 20nm、约 1nm 到约 10nm、约 1nm 到约 5nm、约 20nm 到约 350nm、约 20nm 到约 300nm、约 20nm 到约 250nm、约 20nm 到约 200nm、约 20nm 到约 150nm、约 20nm 到约 100nm 或约 20nm 到约 80nm ;更优选地,约 1nm 到约 20nm 之间或约 1nm 到约 5nm 之间。

在一个实施例中,金属纳米粒子可堆迭形成金属粒子。该金属粒子也可用于治疗和 / 或预防神经病症。

应了解,用于促进或治疗所需的金属纳米粒子的量将不仅随着所选特定纳米粒子而变化,并且还随着投与途径、需要治疗的病况的性质以及患者的年龄和状况 (其将视主治医师的判断而定) 而变化。在一个实施例中,金属纳米粒子可投与至一个体以介于约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 2,000 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 1,000 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 500 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 250 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 125 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 100 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 75 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 50 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 25 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 10 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 5 微克 / 公斤 / 天 ;优选地,对人类为约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 20 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 10 微克 / 公斤 / 天或约 0.01 微克 / 公斤 / 天到约 1 微克 / 公斤 / 天 ;更优选地,对人类为约 0.05 微克 / 公斤 / 天到约 5 微克 / 公斤 / 天的范围。在另一个实施例中,金属纳米粒子可投与至一个体以介于约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 1,000 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 500 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 250 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 125 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 100 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 75 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 50 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 25 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 10 毫克 / 公斤 / 天 ;或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 5 毫克 / 公斤 / 天 ;优选地,对人类为约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 10 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 5 毫克 / 公斤 / 天或约 0.01 毫克 / 公斤 / 天到约 1 毫克 / 公斤 / 天 ;更优选地,对人类为约 0.02 毫克 / 公斤 / 天到约 1 毫克 / 公斤 / 天的范围。

所需剂量可以以单剂量形式或以以适当间隔投与的分次剂量的形式 (例如,以每天两次、三次、四次或更多次给药的形式) 呈现。尽管对于治疗而言有可能以化学原料形式投与化合物,但优选地以医药组合物的形式呈现活性成分。本发明因此进一步提供如本文所描述的金属纳米粒子或金属粒子连同一或多种医药上可接受的载剂以及任选地其它治疗和 / 或预防成分一起的医药组合或组合物。载剂在与配制品的其它成分相容并且对受体无害的意义上必须是“可接受的”。

本发明的金属纳米粒子或金属粒子或其组合物还可以通过各种方法向个体投与。举例来说,本发明的纳米粒子或其组合物可以通过经口投与 (包括管饲法)、吸入、皮下投与 (S.C.)、静脉内投与 (I.V.)、腹膜内投与 (I.P.)、肌肉内投与 (I.M.)、鼻内投与以及所述模式的组合来投与。在本发明的其它实施例中,本发明的纳米粒子或其组合物可以通过局部施加 (例如,经皮、软膏、乳膏、油膏、滴眼剂等) 投与。还可以设想额外投与模式。

另外,本发明的金属纳米粒子或金属粒子或其组合物可以投与到个体体内的局部部

位，例如已罹患神经病症的组织或脉管系统。举例来说，本发明的金属纳米粒子或组合物可以直接注射到个体需要神经突生长增加的大脑或脊柱中。

本发明的金属纳米粒子或金属粒子或其组合物还可以用于靶向治疗。举例来说，在 一些实施例中，治疗组合物可以与用于穿过血脑屏障的靶向试剂相关和 / 或结合。

在各种实施例中，金属纳米粒子或金属粒子可以任选地彼此或与其它已知适用于治疗相关疾病或病况的试剂组合或与其共同投与。因此，例如在 ALS 治疗中，金属纳米粒子可以与利鲁唑 (Riluzole)（力如太 (Rilutek)）、二甲胺四环素、类胰岛素生长因子 1(IGF-1) 和 / 或甲基钴维生素组合投与。在另一实例中，在帕金森氏病治疗中，金属纳米粒子可以与左旋多巴 (L-dopa)、多巴胺激动剂（例如，溴麦角环肽 (bromocriptine)、培高利特 (pergolide)、普拉克索 (pramipexole)、罗匹尼洛 (ropinirole)、卡麦角林 (cabergoline)、阿朴吗啡 (apomorphine) 以及麦角乙脲 (lisuride))、多巴脱羧酶抑制剂（例如左旋多巴、苄丝肼 (benserazide) 以及卡比多巴 (carbidopa)) 和 / 或 MAO-B 抑制剂（例如司来吉兰 (selegiline) 和雷沙吉兰 (rasagiline)) 一起投与。在另一实例中，在阿尔茨海默氏病治疗中，金属纳米粒子可以与乙酰胆碱酯酶抑制剂（例如多奈哌齐 (donepezil)、加兰他敏 (galantamine) 以及雷斯替明 (rivastigmine)) 和 / 或 NMDA 受体拮抗剂（例如美金刚 (memantine)）一起投与。组合疗法可以涉及通过如由所属领域的技术人员确定为适当的相同或不同途径同时或连续投与。本发明还包括包含如本文所描述的组合的医药组合物和套组。

神经突生长

本发明提供金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途，所述组合物、试剂盒或医疗装置用于改进个体的神经元的神经突生长。确切地说，金属纳米粒子或金属粒子或其组合物或组合可以促进轴突和树突的生长。通过使神经元暴露于作用范围的金属纳米粒子或其组合物或组合，轴突和树突的长度和密度增加并且通过再生恢复。

神经疾病

本发明提供金属纳米粒子或由复数个金属纳米粒子堆栈形成的金属粒子在制备组合物、试剂盒或医疗装置中的用途，所述组合物、试剂盒或医疗装置用于治疗和 / 或预防个体的神经病症的用途。因此，这些金属纳米粒子或金属粒子或其组合物或组合适用于例如以下各者的治疗 :(i) 神经系统病症（例如神经变性疾病），(ii) 继发于对神经系统外部具有原发性影响的疾病、病况或治疗的神经系统病况，(iii) 由物理、机械或化学创伤造成的神经系统损伤，(iv) 记忆丧失以及 (v) 精神病症。以下提供这些疾病、病况以及损伤中的一些的非限制性实例。

可以通过根据本发明促进神经突生长来预防或治疗的神经变性疾病和病况的实例包括肌肉萎缩性侧索硬化 (ALS)、三叉神经痛、舌咽神经痛、贝尔氏麻痹、重症肌无力、肌肉萎缩症、进行性肌肉萎缩、原发性侧索硬化 (PLS)、假性延髓麻痹、进行性延髓麻 痹、脊髓性肌肉萎缩、进行性延髓麻痹、遗传性肌肉萎缩、无脊椎盘综合征（例如，成疝、破裂以及脱垂盘综合征）、颈椎病、丛病症、胸廓出口毁坏综合征、外周神经病、卟啉症、轻度认知障碍、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、帕金森叠加综合征（例如，多发性系统萎缩症、进行性核上麻痹以及皮质基底核变性症）、路易体痴呆、额颞叶痴呆、脱髓鞘疾病（例如，吉

兰-巴雷综合征和多发性硬化症)、恰克-马利-杜斯氏疾病(CMT;也称为遗传性运动和感觉神经病(HMSN)、遗传性感觉运动神经病(HSMN)以及腓骨肌萎缩症)、朊病毒病(例如,克雅二氏症、格-斯二氏综合征(GSS)、致命性家族性失眠症(FFI)以及牛海绵状脑病(BSE,其通常称为疯牛病))、皮克氏病、癫痫症以及AIDS痴呆综合征(也称为HIV痴呆、HIV脑病以及HIV相关痴呆)。

某些对神经系统外部具有原发性影响的疾病和病况可以导致神经系统损伤,其可以根据本发明的方法治疗。所述病况的实例包括由例如糖尿病、癌症、AIDS、肝炎、肾脏功能障碍、科罗拉多壁虱热、白喉、HIV感染、麻疯病、莱姆病、结节性多动脉炎、类风湿性关节炎、结节病、休格连综合征、梅毒、全身性红斑性狼疮症以及淀粉样变性导致的周边神经病和神经痛。

另外,本发明可以用于治疗例如周边神经病的神经损伤,所述神经损伤是由暴露于以下毒性化合物导致的,包括:重金属(例如铅、砷以及汞)和工业溶剂;以及药物,包括化学治疗剂(例如长春新碱和顺铂)、氨苯砜、HIV药物(例如齐多夫定(Zidovudine)、地达诺新(Didanosine)、司他夫定(Stavudine)、扎西他滨(Zalcitabine)、利托那韦(Ritonavir)以及安普那韦(Amprenavir))、降胆固醇药物(例如洛伐他汀(Lovastatin)、吲达帕胺(Indapamid)以及吉非罗齐(Gemfibrozil))、心脏或血压药物(例如胺碘酮(Amiodarone)、肼酞嗪(Hydralazine)、哌克昔林(Perhexiline))以及甲硝哒唑(Metronidazole)。

本发明还可以用于治疗由物理、机械或化学创伤造成的神经系统损伤。因此,所述方法可以用于治疗由物理损伤(与例如烧伤、创伤、手术以及事故相关)、局部缺血、长时间暴露于低温(例如,冻伤)导致的周边神经损伤以及由于例如中风或颅内出血(例如脑出血)造成的中枢神经系统损伤。

此外,本发明可以用于预防或治疗记忆丧失,例如年龄相关的记忆丧失。可以受丧失影响并且因此根据本发明治疗的记忆类型包括间歇性记忆、语义记忆、短期记忆以及长期记忆。与可以根据本发明治疗的记忆丧失相关的疾病和病况的实例包括轻度认知障碍、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、化学疗法、压力、中风以及创伤性脑损伤(例如震荡)。

本发明还可以用于治疗精神病症,包括例如精神分裂症、妄想症、分裂情感性精神 障碍、类精神分裂症精神病、共有型精神障碍、精神病、偏执型人格障碍、分裂性人格障碍、边缘型人格障碍、反社会型人格障碍、自恋型人格障碍、强迫症、谵妄、痴呆、情绪障碍、躁郁症、抑郁症、应激障碍、恐慌症、畏旷症、社交恐惧症、创伤后应激障碍、焦虑症以及冲动控制障碍(例如盗窃癖、病理性赌博、放火癖及拔毛癖)。

除了上文所描述的用途以外,本发明可以用于活体外处理神经,其可以在神经移植物或神经移植体的情况下具有帮助。因此,本文中提供的金属纳米粒子可以适用作供活体外培养神经细胞使用的培养基的组份。

在另一方面中,本发明提供一种组合物、试剂盒或医疗装置,其包含足以治疗和/或预防神经病症的量的金属纳米粒子或金属粒子。本发明还提供一种用于治疗和/或预防神经病症的用途,所述用途包含在个体中使用含有有效量的金属纳米粒子的医疗装置,从而治疗和/或预防神经病症。任何用于神经系统的医疗装置可以用于本发明。在一个实施例中,医疗装置是可植入导管。

本发明的某些方面可以在以下非限制性实例中更详细地描述。

实例

实例 1 神经突生长分析

金纳米粒子是由 GNT 生物技术和医药公司 (GNT Biotech&Medicals Co.)(台湾台北市 (Taipei,Taiwan)) 提供,其是根据台湾专利第 I430858 号中所公开的制造系统和方法制备。

从怀孕 18 天的 SD 大鼠的胚胎获得原代皮层神经元。蒸煮皮层组织并且接着用含有 5%胎牛血清、5%马血清以及 5μg/ml 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒的最小必需培养基平板接种。接种密度为 5×10^4个细胞 / 毫升的细胞并且在培育箱中在 37℃、5% CO_2下培养。在 3 到 6 小时之后,用神经基质培养基 (2% B27- 神经基质培养基,含有 0.5mM 谷氨酸盐和 12.5uM 谷氨酰胺) 替换平板接种培养基以用于培养。

测试在神经元的不同发育阶段添加的金纳米粒子的作用。一般来说,在活体外第 2 到 3 天 (DIV) 测定经培养神经元轴突,接着是树突测定。分别在第一天 (DIV1)、第二天 (DIV2) 以及第三天 (DIV3) 向原代皮层神经元添加 0.5ppm 金纳米粒子。在培养细胞直到第六天 (DIV6) 之后,进行免疫荧光染色。与对照组 (图 1A) 相比,金纳米粒子处理神经元显示轴突 (绿色) 和树突 (红色) 的更长并且更多的分枝。细胞核被 DAPI(蓝色) 染色 (图 1B、C 以及 D)。

还评估了金纳米粒子对神经突生长的作用。在 DIV2 向原代皮层神经元添加 0.1ppm、0.3ppm 以及 0.5ppm 金纳米粒子。在 8 天培养之后,进行免疫荧光染色。与对照 组 (图 2A) 相比,经金纳米粒子处理的神经元显示轴突 (绿色) 和树突 (红色) 的更长并且更多的分枝。细胞核被 DAPI(蓝色) 染色 (图 2B、C 以及 D)。

评估了金纳米粒子对处于不同细胞密度下的细胞的分化的作用。分别向处于 5×10^3个细胞 / 毫升、3×10^4个细胞 / 毫升以及 6×10^4个细胞 / 毫升密度下的细胞样品添加 0.3ppm 金纳米粒子。在培养细胞 4 天之后,进行免疫荧光染色。与对照组 (图 3A 和 C) 相比,对于处于 5×10^3个细胞 / 毫升 (图 3B) 和 3×10^4个细胞 / 毫升 (图 3D) 密度下的细胞,轴突 (绿色) 和树突 (红色) 的长度和分枝增加。对于处于 6×10^4个细胞 / 毫升密度下的细胞观察到轻微变化 (图 3E 和 F)。使用划痕测试以评估金纳米粒子在神经再生中的作用。将密度为 1×10^6个细胞 / 毫升的原代皮层神经元培养到 DIV5。进行划痕测试。使用具有 200p 的探针来标记在培养盘的孔处的穿过。将分别含有 0.3ppm 和 0.5ppm 金纳米粒子的培养基添加到培养盘。在培养 72 小时之后,进行免疫荧光染色。与对照组 (图 4A) 相比,在 0.3ppm 与 0.5ppm 金纳米粒子处理组两者 (图 4B 和 C) 中再生轴突 (绿色) 的密度增加。

[0006] 为了探讨小型纳米粒子的效果,将浓度为 0.5ppm、0.75ppm、1ppm 及 1.25ppm 的 1nm 到 5nm 大小的金纳米粒子在第二天 (DIV2) 分别加入原代皮层神经元。96 小时培养后,执行免疫荧光染色。与对照组相比 (每轴突平均长度 375.1μm),以 1nm 到 5nm 金纳米粒子处理的神经元显示较长的轴突 (绿色)(0.5ppm、0.75ppm、1ppm 与 1.25ppm 金纳米粒子分别为每轴突平均长度 484.2μm、每轴突平均长度 491.8μm、每轴突平均长度 437.2μm 与每轴突平均长度 430.8μm)。类似地,将浓度为 0.5ppm、0.75ppm、1ppm 及 1.25ppm 的 1nm 到 20nm 大小的金纳米粒子在 DIV2 分别加入原代皮层神经元。与对照组相比 (每轴突平均长度 320.2μm),以 1nm 到 20nm 金纳米粒子处理的神经元显示较长的轴突 (绿色)(0.5ppm、

0.75ppm、1ppm 与 1.25ppm 金纳米粒子分别为每轴突平均长度 412.5μm、每轴突平均长度 403μm、每轴突平均长度 467.5μm 与每轴突平均长度 384μm)。

[0007] 将大小为 1nm 到 5nm 的金纳米粒子与大小为 1nm 到 20nm 的金纳米粒子进行如上述之划痕测试。结果显示大小为 1nm 到 5nm 与大小为 1nm 到 20nm 的金纳米 粒子增加再生的轴突之密度 (1nm 到 5nm 金粒子见图 5 及 1nm 到 20nm 金纳米粒子见图 6)。

实例 2 莫里斯水迷宫 (Morris Water Maze) 任务分析

1nm to 5nm 的金纳米粒子被用于水迷宫分析四天。20 只 8 周大的 SD 大鼠用于分析并且被分成二组 (每组 10 只小鼠)。一个组经受 1nm to 5nm 的金纳米粒子 (0.5 微克 / 公斤 ;AuNP 组) 腹膜内注射 (i.p.) ;一个组经受用 PBS 的 i.p.(对照组)。投与时间表、给药途径以及药物浓度在下表中显示。

组	对照	I.P. NG 组
投与时间	一周投与三次	
投与途径	腹膜内注射(i.p)	
药物浓度	PBS	0.5 ppm

[0008] 所述水迷宫方法采用自先前研究 (Y.C.Yang, Y.L.Ma, W.T.Liu, and E.H.Lee, " Laminin-betal impairs spatial learning through inhibition of erk/mapk and sgk1signaling, Neuropsychopharmacology, vol.36, no.12, pp.2571-2586, 2011) 并经调整。一高 0.6 公尺且直径 2.0 公尺的塑料圆形泳池注水 (25+/-2℃) 至 35 公分深。将一圆形平台 (直径 20 公分) 放置于距所述泳池边缘的特定位置且浸于水表面下 2 至 3 公分。以无毒染料使水呈混浊状。将视觉上鲜明的杆设置于墙上。为了空间的学习,动物每天接受 3 个试验,一个试验在清晨、一个试验在正午及另一个在傍晚。所述训练过程持续 4 天,并总共给予 12 个试验。因加速记忆较整合较佳的模式为间隔的训练故采用所述过程。这些试验中,将所述大鼠以随机顺序放置于与周围等距的不同的起始点。牠们有 120 秒可找到隐藏的平台。若一大鼠不能找到所述平台,牠会被引导至所述平台并且让牠在那边停留 20 秒。将每只动物到达所述平台所花的时间记录为逃出延迟时间。第 5 天进行 120 秒的探针试验以测试其记忆保留。所述大鼠被放置于平台被移除的所述泳池中,记录牠们在每个象限所花的时间 (象限 1、2、3 与 4)。象现 3 为标靶象限。所述训练与游泳的对照实验中,训练组的大鼠接受所述常规的水迷宫学习过程。

[0009] 结果显示与对照组相比,AuNP 组别花较少时间找到所述平台 (见图 7A) 且与第二天开始的对照组相比,所述 AuNP 组花较少时间找到所述平台 (见图 7B)。所述试验之第 4 天后,将该平台移除且进行一探针试验。在探针试验 7 天后,在 AuNP 组别中,所述大鼠停留于所述象限 (平台被移除的) 的时间与对照组相比较长 (见图 7C)。

[0010] 更进一步,经本发明的金纳米粒子堆栈的金粒子接受所述水迷宫测试。将 1.03mg/kg/day 的金纳米粒子经口投与至小鼠持续 2 周,所述结果显示于图 8(8A 与 8B 分别为在试验天数中的所述小鼠的逃出延迟时间与牠们在每象限中所花的时间)。

实例 3 金纳米粒子对横切坐骨神经损伤大鼠模型的作用的运动功能恢复分析

坐骨神经使后爪受神经支配,并且坐骨神经的横切是周边神经损伤的模型。将 ICR 雄性大鼠随机分为四个组 (三只大鼠 / 每组)。用含有 50% 舒泰 (zoletil) 和 2% 隆朋 (rompun) 的药剂麻醉大鼠。一组麻醉大鼠经受外科手术但未横切坐骨神经 (未处理组)。

以外科手术方式横切另外三组麻醉大鼠的坐骨神经，其中向一组大鼠的坐骨神经直接投与0.9％ NaCl（作为仅有神经损伤的对照物），向一组大鼠的坐骨神经局部直接投与0.5ppm NG，并且一组大鼠在手术后（OP后）通过腹膜内注射（i.p.）大鼠投与0.5ppm NG。投与时间表在下表中列出。

组	未处理	神经损伤	神经损伤+局部施加NG	神经损伤+ OP后IP NG
坐骨神经横切	否	是	是	是
投与药物	否	0.9％NaCl	0.5 ppm NG	
投与药物的时间	否	立即向横切坐骨神经局部添加0.9％ NaCl		手术后腹膜内注射(i.p)

在外科手术之前和之后分别进行旋杆性能测试以评估小鼠的横切坐骨神经的再生。将大鼠放置在2rpm下的旋杆的水平定向旋转圆柱（杆）上持续5分钟。随后，在20分钟内将旋杆的速度增加到20rpm并且记录小鼠跌落到地上的时间。恢复率是通过外科手术之后的小鼠跌落到地上的时间除以外科手术之前的小鼠跌落到地上的时间来计算。在投与NG一周之后，用金纳米粒子处理的坐骨神经受损小鼠的运动功能显着恢复，而坐骨神经受损对照组仅在四周之后略微恢复（图9）。

使用平衡木测验在横切坐骨神经损伤大鼠中进一步测试运动协调（梅茨，G.A.S.(Metz，G.A.S.）等人，在脊髓受损大鼠中的运动功能有效测试(Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats).脑研究(Brain Research)，2000.883(2)：第165页；卡明斯，B.J.(Cummings，B.J.）等人，调适阶梯梁行走任务以评估小鼠在脊髓损伤之后的运动恢复(Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury).行为大脑研究(Behav Brain Res)，2007.177(2)：第232到41页）。在梁上的表现是通过测量小鼠横穿梁所需的时间和在所述过程中出现的爪滑的次数来定量。测试重复三次执行。大鼠横穿梁所需的时间对于未处理组是18.5秒，对于神经损伤组是14.67秒，对于神经损伤+局部施加NG组是11.73秒并且对于神经损伤+OP后IP NG组是11.73秒（参见图10）。

实例4新物体识别测试

新物体识别测试是使用特征小鼠对于新颖性的偏好的测试，其由于所述测试不使用任何人工强化因素而不同于其它学习评估方法。训练设备是透明的树脂玻璃(Plexiglas)盒(48cm×38cm×27.5cm)，所述盒用白色屏蔽覆盖以使得小鼠无法看到周围环境。将小鼠在无压力的情况下放置在盒中10分钟以用于适应。24小时之后，将两个具有相同形状和颜色的物体放置在盒中。接着将小鼠放置在盒中并且允许其探究所述两个相同物体5min，并且记录探究两个物体所花费的总时间和频率。3小时之后，将在盒子右侧的物体变为具有与在盒子左侧的物体的形状和颜色不同形状和颜色的物体，并且接着将小鼠放置在盒中5分钟。记录探究两个物体所花费的总时间和频率。

24小时之后，将两个相同的、不同于上文所提及的物体的物体放置在盒中。接着将小鼠放置在盒中5分钟，并且记录探究两个物体所花费的总时间和频率。24小时之后，将在盒子右侧的物体变为具有与在盒子左侧的物体的形状和颜色不同形状和颜色的物体，并且接着将小鼠放置在盒中5分钟。记录探究两个物体所花费的总时间和频率。

实例 5 细胞活力分析

在于 0ppm、1ppm、10ppm、100ppm 浓度下的金纳米粒子处理之后 24h，通过 MTT(3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基四唑溴化物，西格玛 - 阿尔德里奇 (Sigma-Aldrich)) 分析来评估细胞活力。如所属领域中已知的 MTT 分析来执行方案。用 1ml MTT(0.5mg/mL) 试剂 (西格玛 - 阿尔德里奇) 和 9ml 神经基质培养基在 37℃下培育细胞 3h。去除 MTT 溶液，并且在室温下持续 1h 向摇晃的孔中添加 DMSO。MTT 甲腊产物的量是通过测量其在 570nm 和 630nm 下的吸收率来定量，所述测量是通过使用 ELISA 盘读取器 (实验室系统酶标仪 MCC/340(Lab system multiskan MCC/340)，罗马尼亚阿尔杰什市 (Arges，Romania))。

实例 6 抑制性回避学习任务

设备是由被推拉门划分的槽形通道组成，所述推拉门分隔经照亮的安全隔室与暗隔室。将产生电流的电击发生器连接到暗隔室的地面上 (UGO 巴希尔 (UGO Basile)，柯美尼奥 VA(Comerio VA)，意大利 (Italy))。所用的方法是采纳自先前研究的方法，同时伴以修改。在 8:00AM 与 6:00PM 之间记录行为任务，包括训练和测试程序。在实验之前，使大鼠在昏暗房间中适应 1h 以使得其可以适应环境。在训练阶段中，将大鼠放置在经照亮隔室的远端，背对门。在大鼠转身时，门关闭，并且在 2s 之后，给予两次 1mA/s 足底电击。大鼠接着被从通道移出并且返回到其笼中。在训练之后的不同时间 (1d 和 7d 之后)，给予保持力测试。在 1 天和 7 天之后以如训练中的相同方式测试大鼠，但不使其接受电击。当大鼠进入暗室或在 600s 之后仍未进入时，终止测试。未进入暗隔室并且达到 600s 上限评分的大鼠从通道移出并且被指定为具有良好记忆的大鼠。放置在暗隔室中的直接接受足底电击 (1mA/s，持续 2s) 的动物被分配到仅接受足底电击的对照组。

实例 7 跳台被动回避测试

使动物在训练之前 24h 熟悉仪器。第二天，将大鼠放置在位于被动回避测试盒地面中心处的升高平台上，并且记录到跳台的潜伏期。紧接着跳下之后的实验第三天，动物受到通过网格地面的温和电击 (3V，3 秒持续时间，D.C.)，并且接着被返回到其居住笼中。在第二天 (作为 24h 保持力间隔)，将大鼠再次放置在平台上，但不对其电击。记录到跳台的潜伏期。如果大鼠保持在平台上 5min，那么对其指定 300 秒的最高评分。

实例 8 坐骨神经功能指数 (SFI)

在坐骨神经横切之后四周，使所有动物经受一系列每周一次的肌动活动评估。活动的恢复被视为对右后肢的充分神经挤压后神经再支配的证明，并且通过分析自由行走模式来监测功能恢复。这一方法描述基于行走大鼠的足迹测量值的指数，其提供评估坐骨神经功能状况的可靠并且可容易地定量的方法。对于这一测试，训练大鼠在覆盖 100cm 长、8.5cm 宽轨道底部的白色纸片上行走，所述轨道在暗盒中结束。随后，在动物的后爪足底喷涂暗染料，并且将其放置在轨道上行走。大鼠足迹用于测定以下测量值 : 从脚后跟到第三根脚趾的距离 [足印长度 (PL)]、从第一到第五根脚趾的距离 [足趾宽度 (TS)] 以及从第二到第四根脚趾的距离 [中间足趾宽度 (ITS)]。这三个测量值是从动物的实验 (E) 与正常 (N) 侧两者获得。在每一轨道上获得每一足的若干足印，但每一足仅有三个足印用于确定 E 和 N 侧的平均测量值。这些平均测量值接着被包括在 SFI 式 :SFIO-38.3(EPL-NPL)/NPL+109.5(ETS-NTS)/NTS+13.3(EIT-NIT)/NIT-8.8 中。所获得的结果被视为坐骨神经的功能指数，其中 0 到 -12 表示极好的功能，-13 到 -99 指示神经功能部分恢复，并且 -100 表示

完全缺乏神经功能。

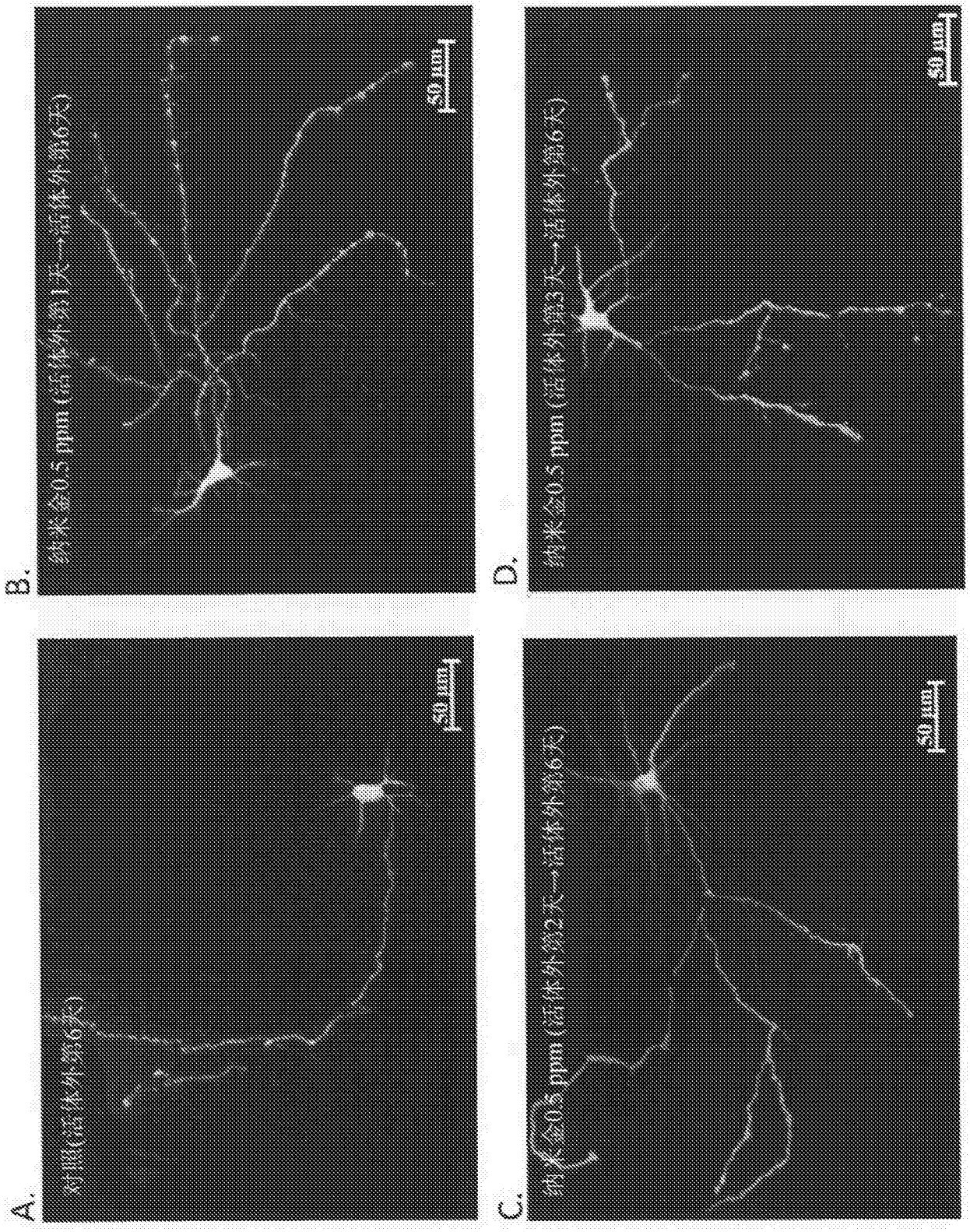


图 1

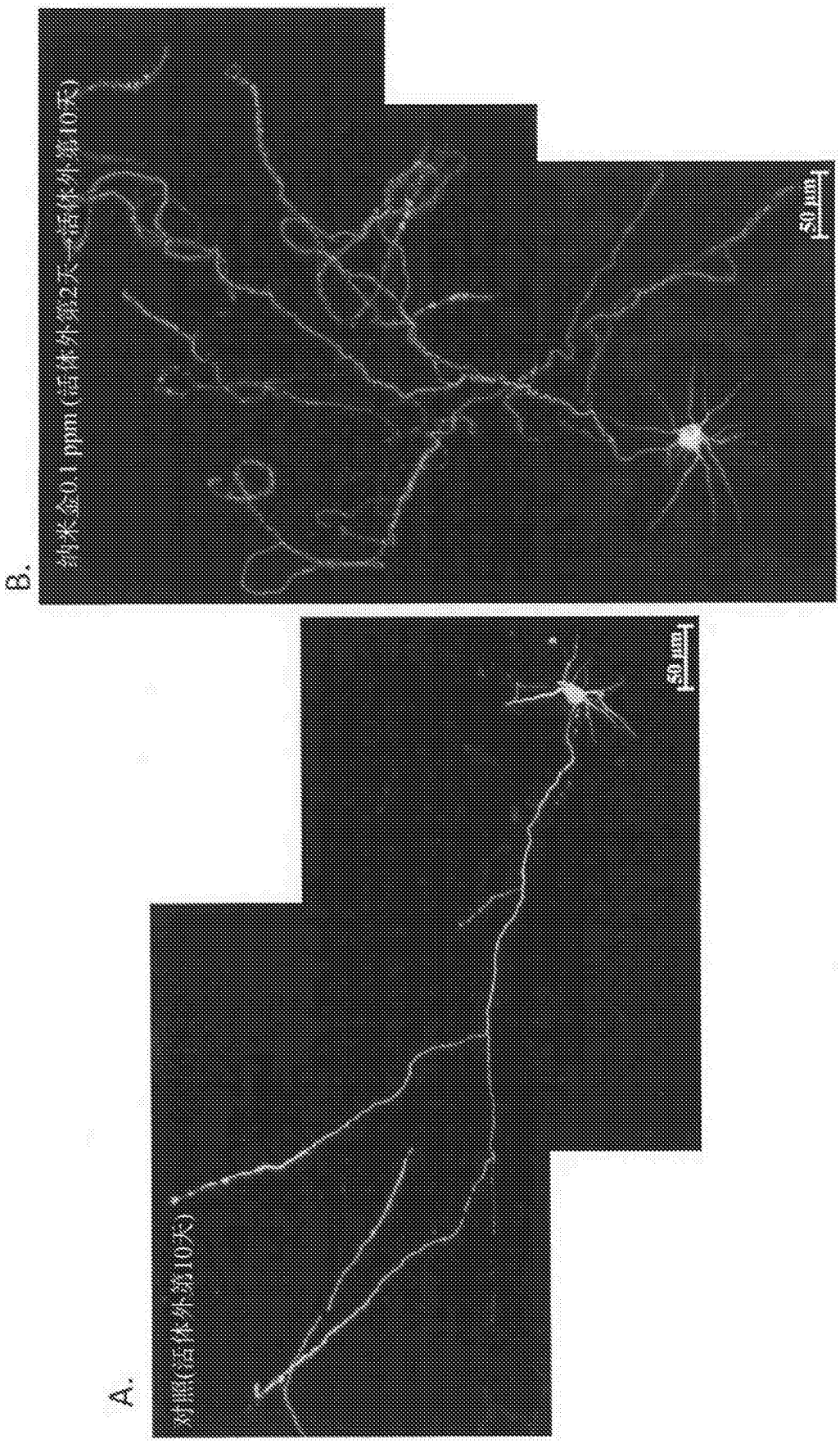


图 2

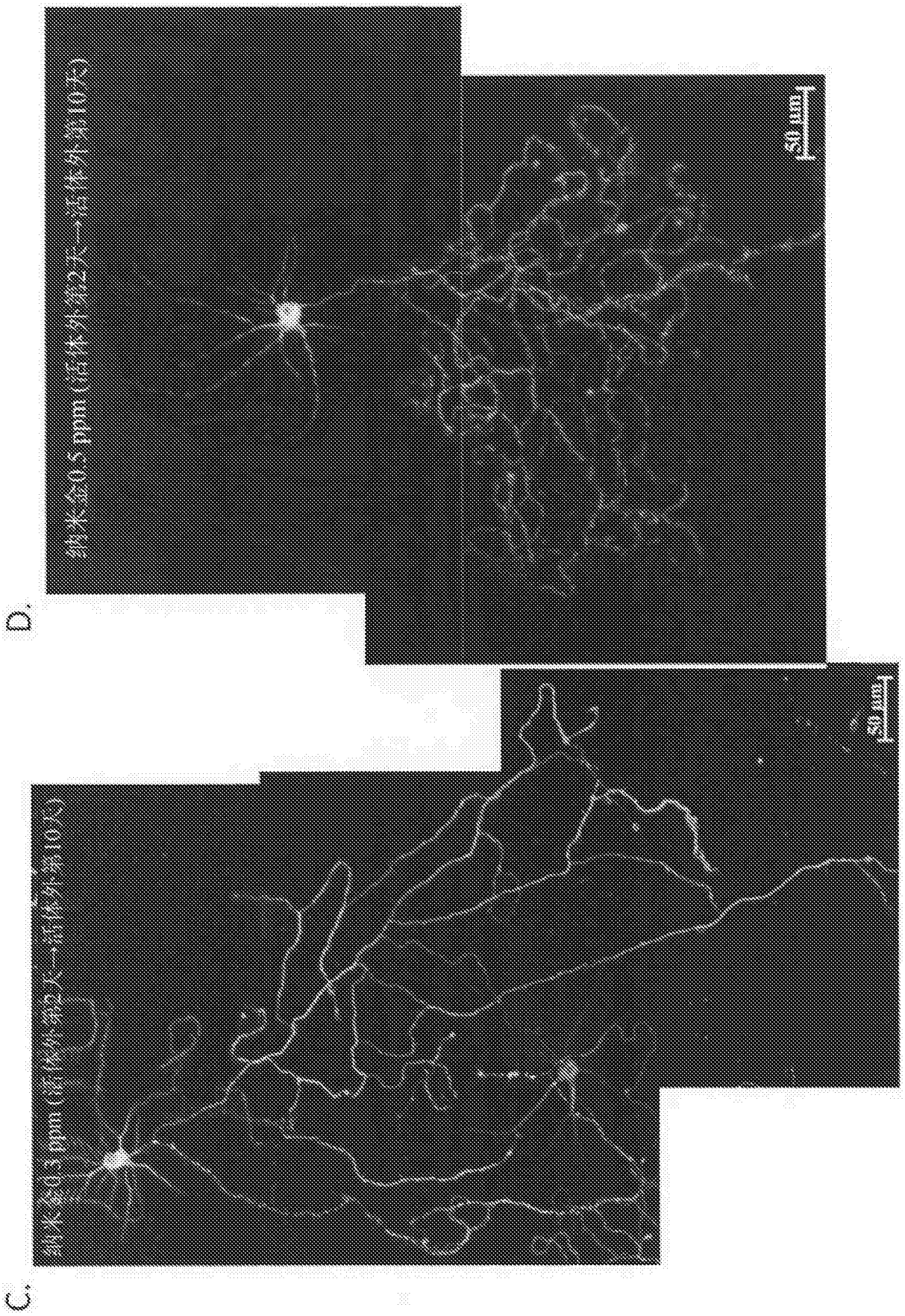

D.
纳米金0.5 ppm (活体外第2天→活体外第10天)
50 μm
C.
纳米金0.3 ppm (活体外第2天→活体外第10天)
50 μm

图 2(续)

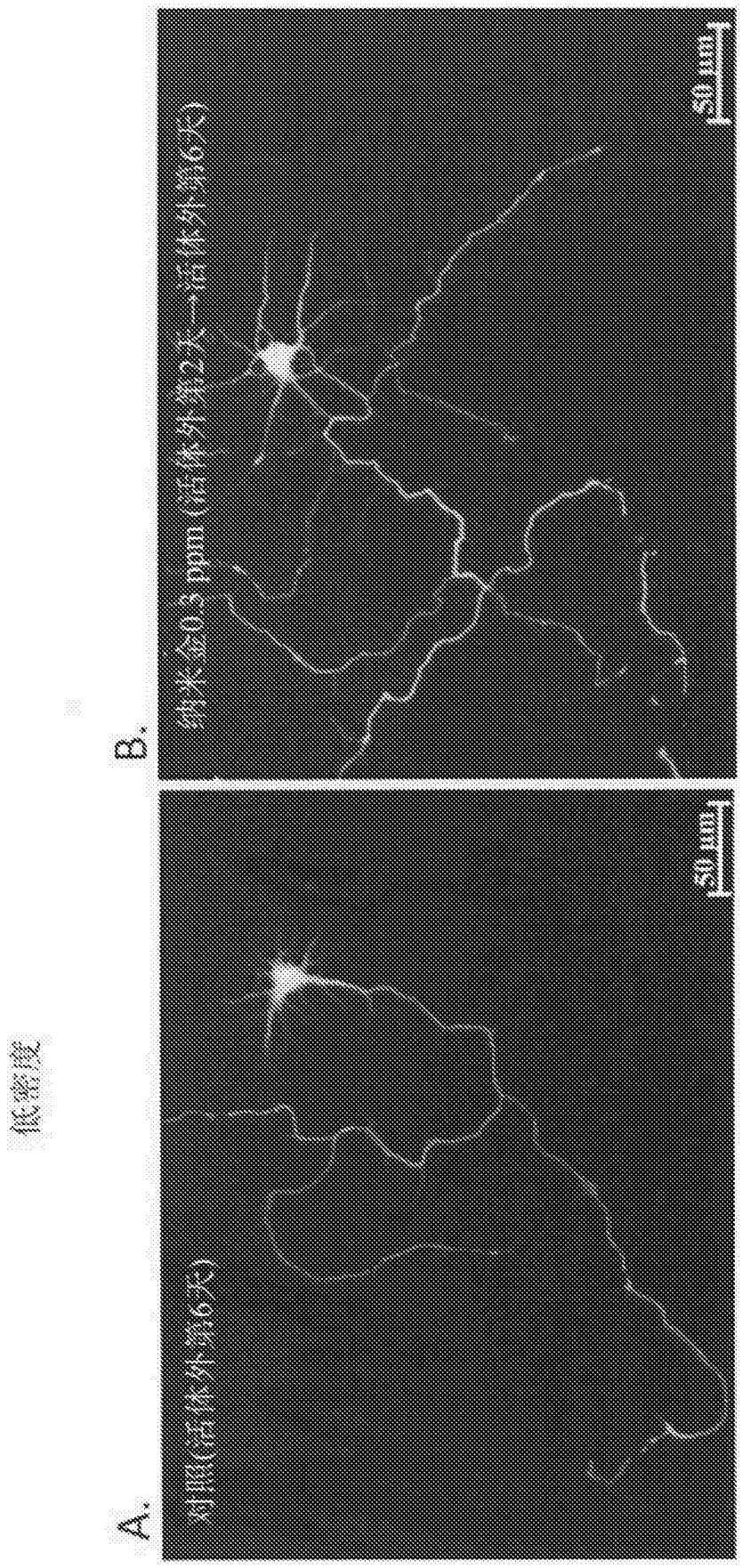


图 3

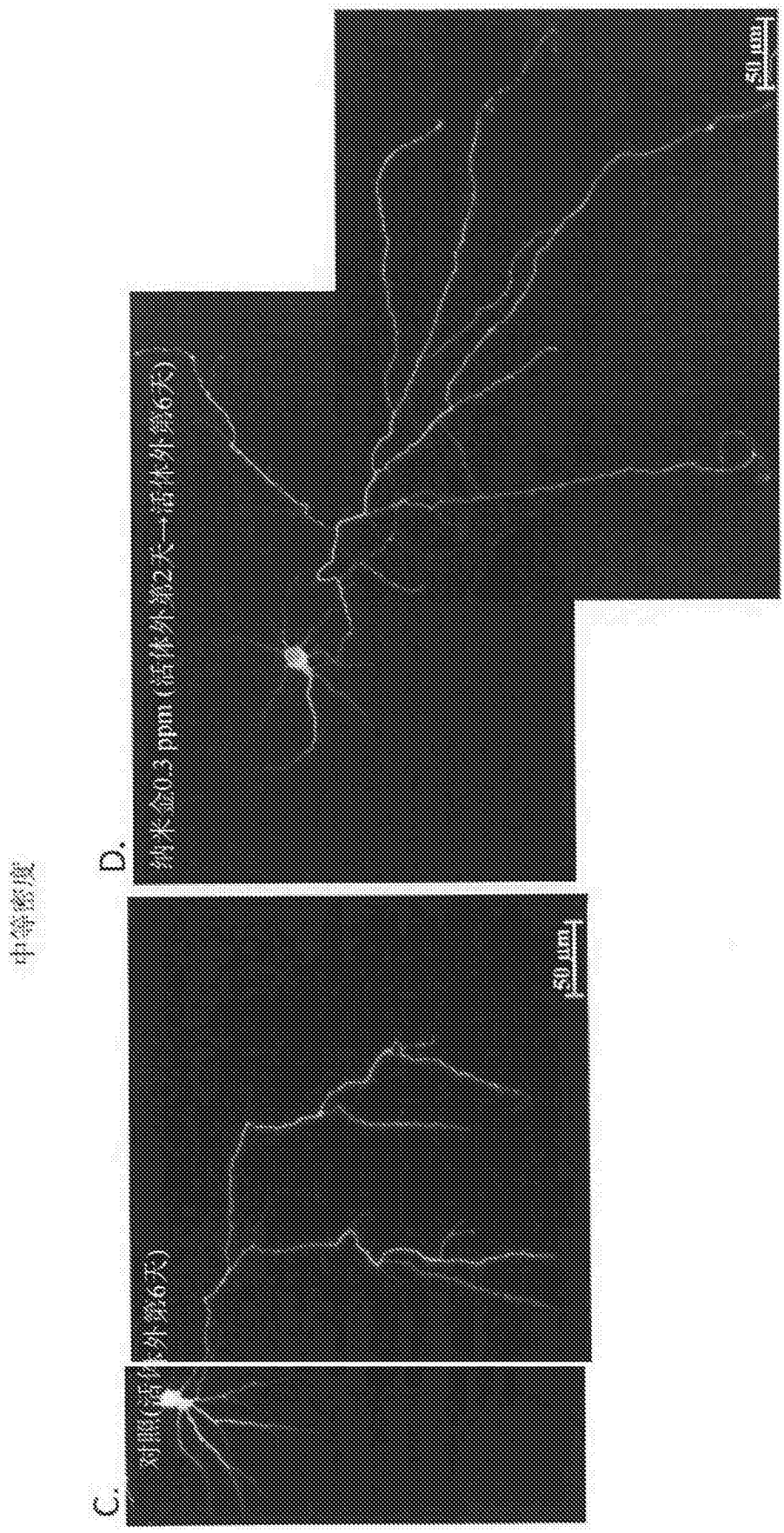


图 3(续)

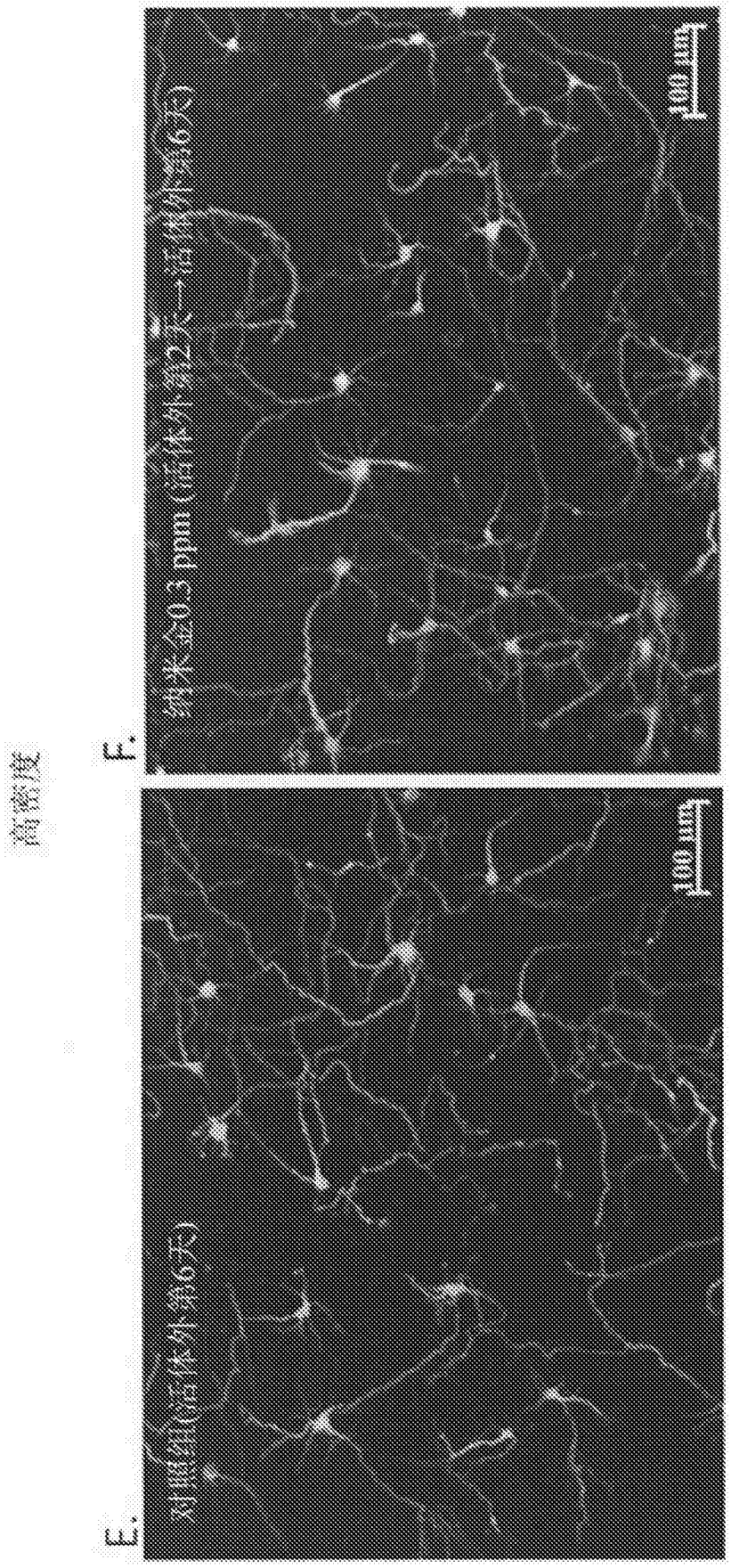


图 3(续)

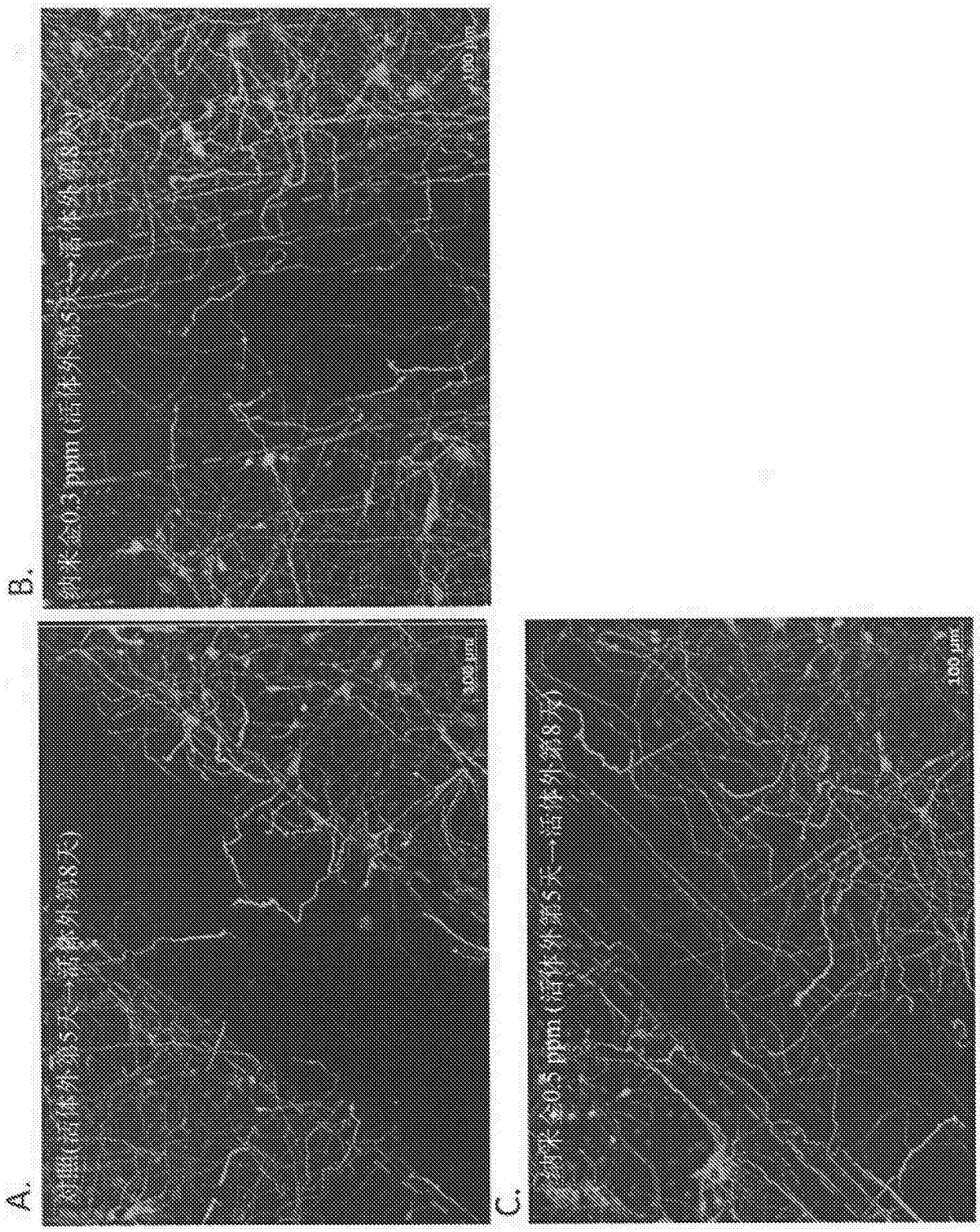


图 4

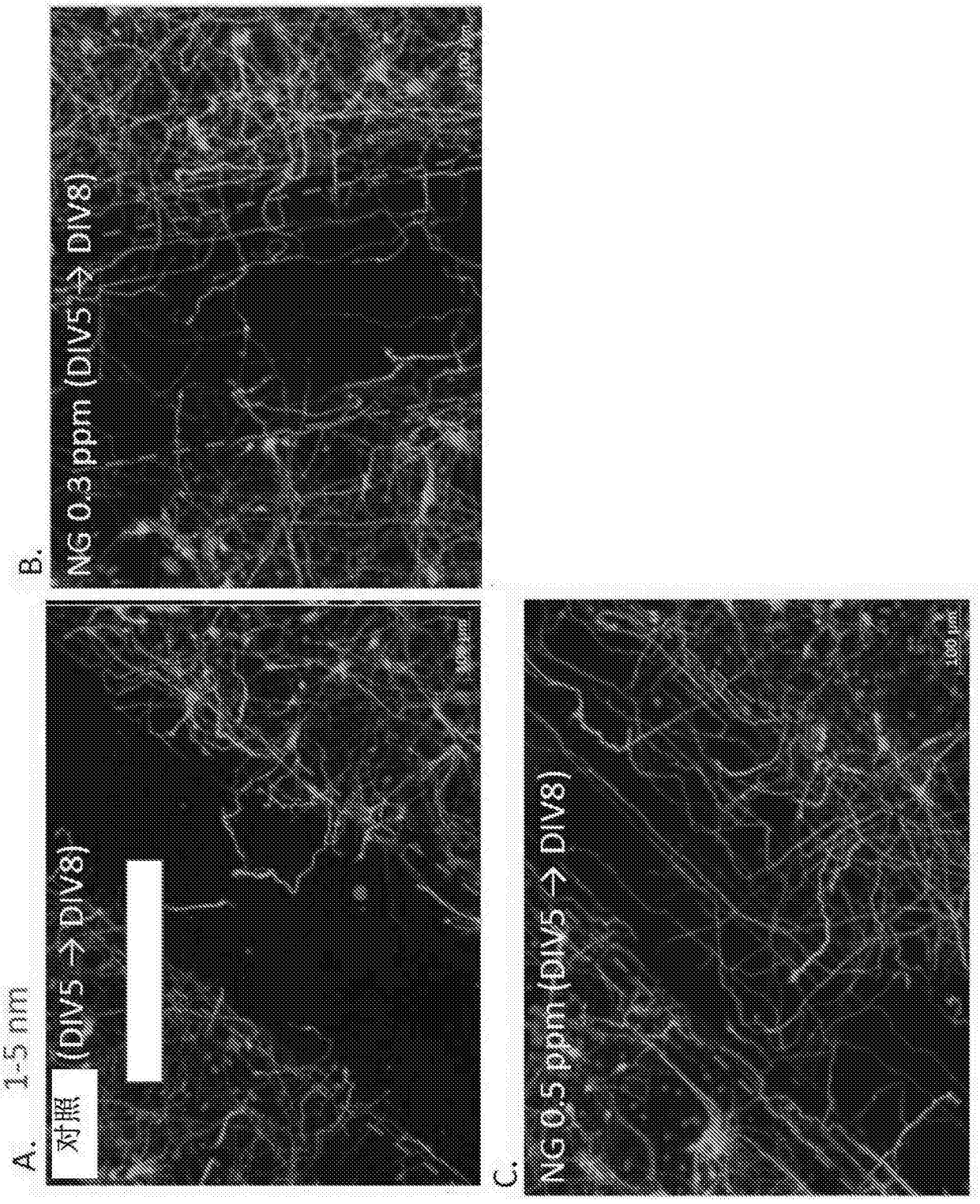


图 5

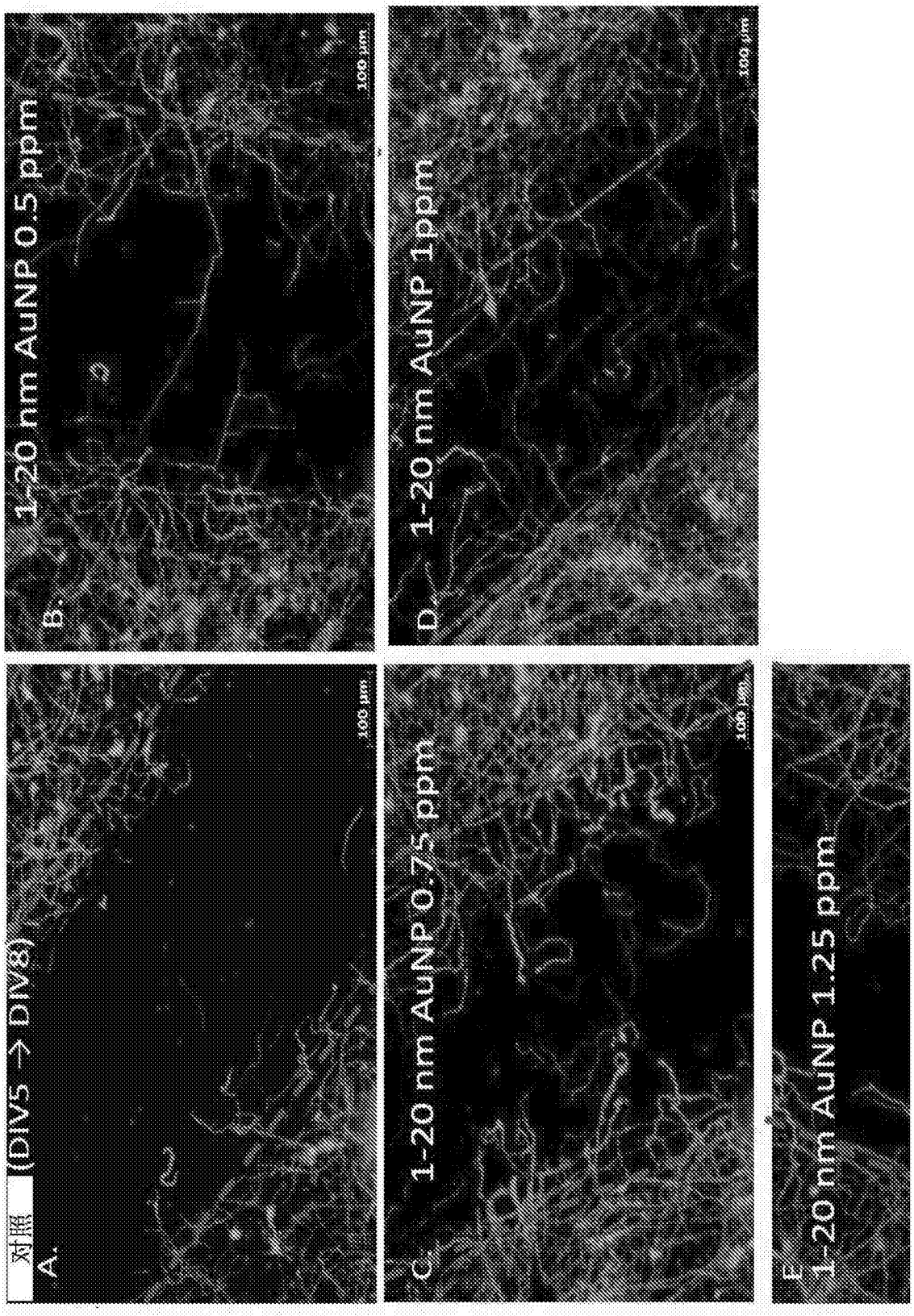

对照 (DIV5 → DIV8)
A.
B. 1-20 nm AuNP 0.5 ppm
C. 1-20 nm AuNP 0.75 ppm
D. 1-20 nm AuNP 1ppm
F. 1-20 nm AuNP 1.25 ppm
100 μm

图 6

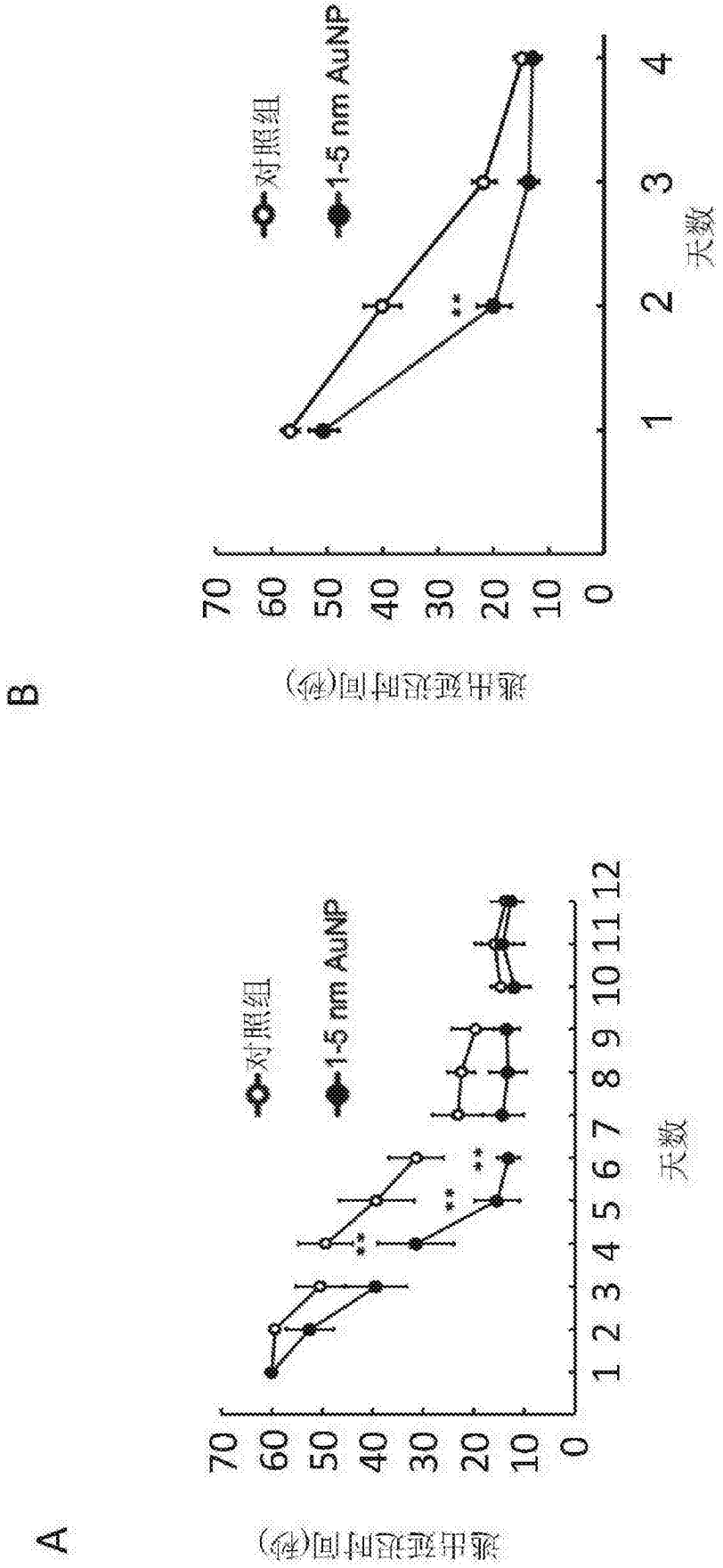
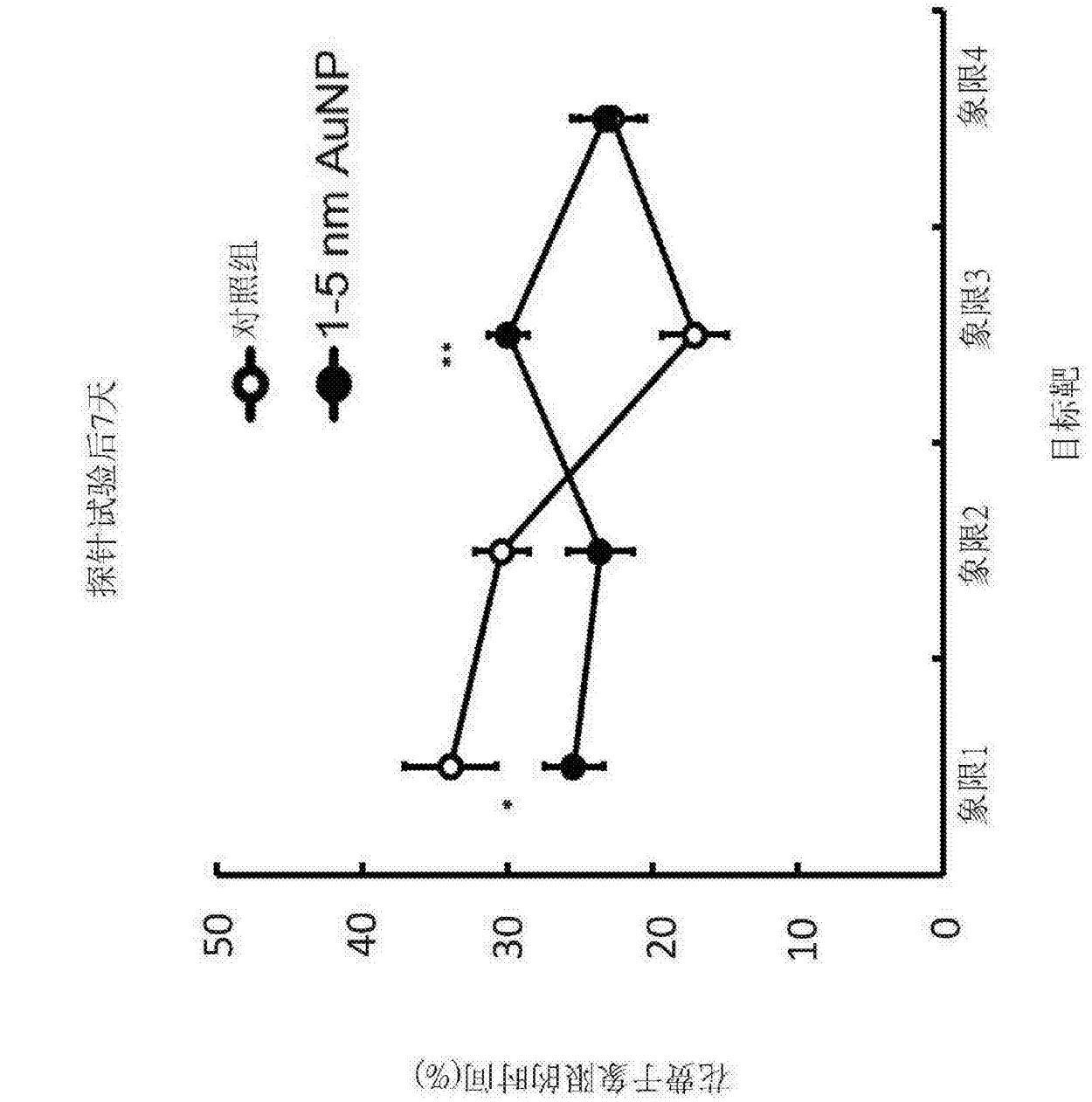

B
逃出延迟时间(秒)
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
天数
对照组
1-5 nm AuNP
**
A
逃出延迟时间(秒)
70
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
天数
对照组
1-5 nm AuNP
**
**
**

图 7


探针试验后7天
对照组
1-5 nm AuNP
**
*
象限1
象限2
象限3
象限4
目标靶
花费于象限的时间(%)
50
40
30
20
10
0

C

图 7（续）

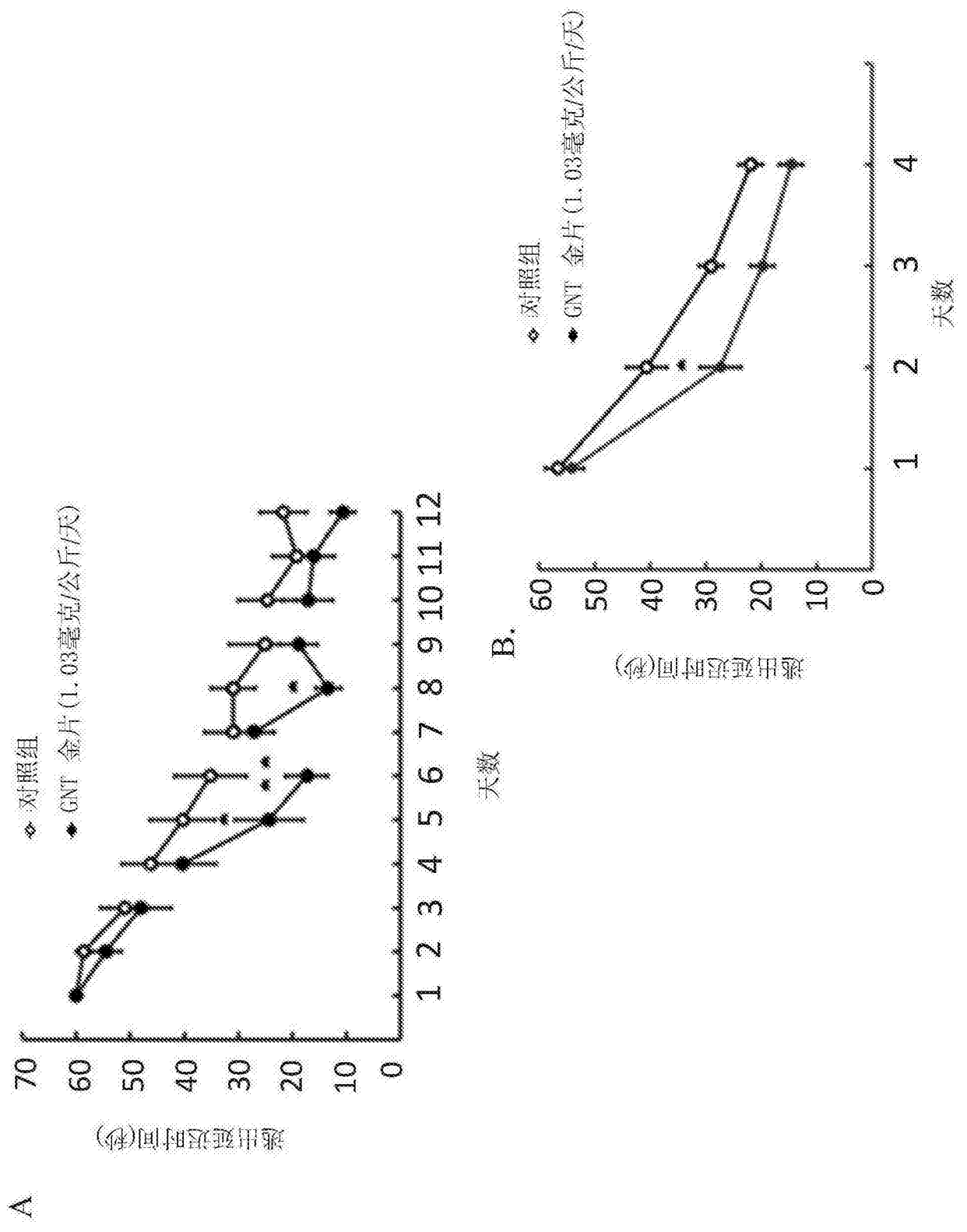

A
逃出延迟时间(秒)
70
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
天数
对照组
GNT 金片(1.03毫克/公斤/天)
B.
逃出延迟时间(秒)
60
50
40
30
20
10
0
1 2 3 4
天数
对照组
GNT 金片(1.03毫克/公斤/天)

图 8

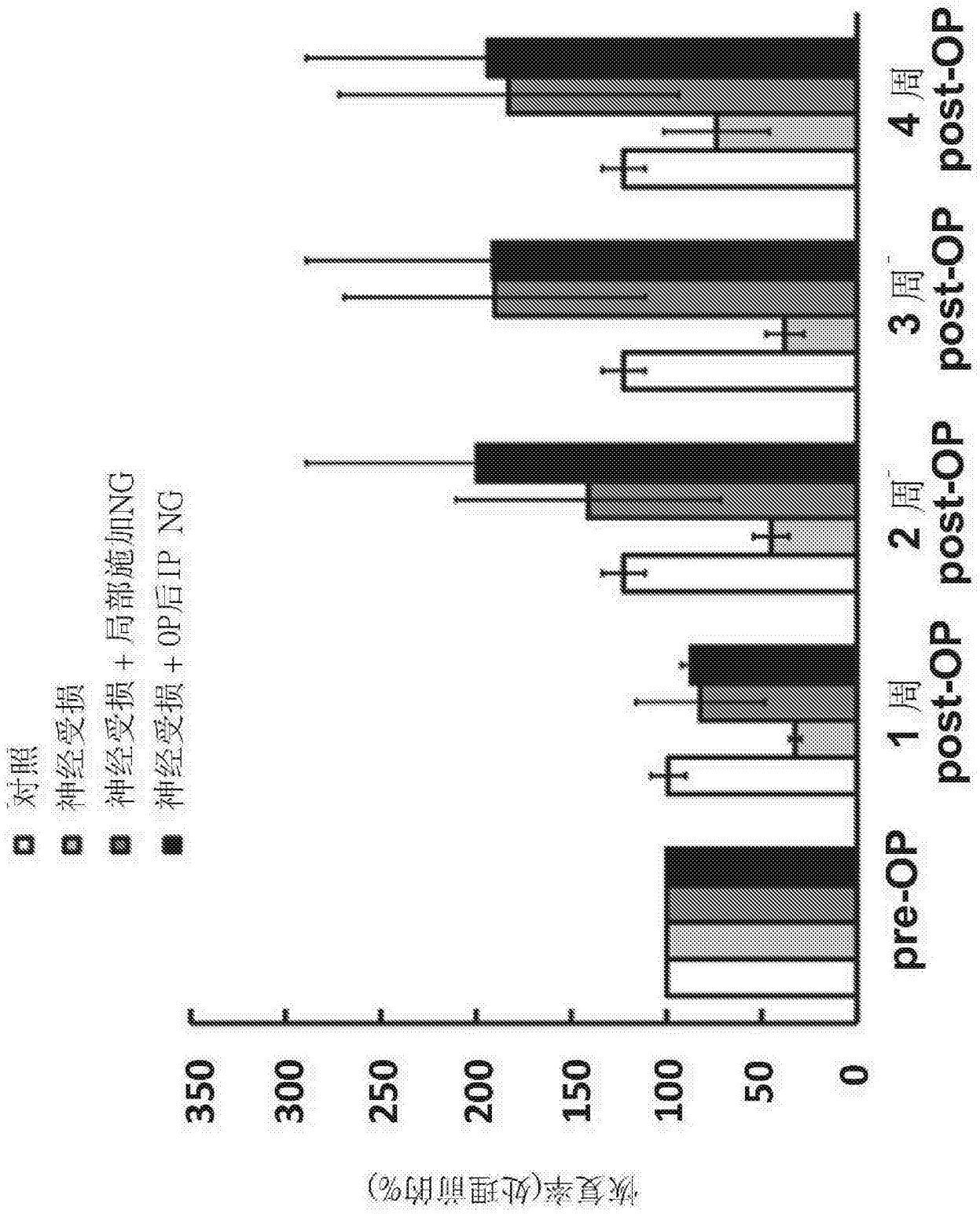

对照
神经受损
神经受损 + 局部施加NG
神经受损 + OP后IP NG
恢复率(处理前的%)
350
300
250
200
150
100
50
0
pre-OP
1 周
post-OP
2 周
post-OP
3 周
post-OP
4 周
post-OP

图 9

图 10