

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 537**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2017 PCT/IL2017/050059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2017 WO17125918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2017 E 17741180 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2023 EP 3405201**

54 Título: **Carbonato de calcio amorfo estabilizado para el tratamiento de enfermedades o afecciones neurológicas, musculares y de infertilidad**

30 Prioridad:

18.01.2016 US 201662279844 P

18.01.2016 US 201662279845 P

18.01.2016 US 201662279843 P

18.08.2016 US 201662376428 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2023

73 Titular/es:

AMORPHICAL LTD. (100.0%)

11 Haharash Street

7403118 Ness Ziona, IL

72 Inventor/es:

BEN, YOSEF;

SHAHAR, ABRAHAM y

ARAV, AMIR

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 952 537 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Carbonato de calcio amorfo estabilizado para el tratamiento de enfermedades o afecciones neurológicas, musculares y de infertilidad

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención proporciona carbonato de calcio amorfo estabilizado (ACC) para el tratamiento de ciertas enfermedades o afecciones musculares y neurológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Se ha demostrado en modelos de biodisponibilidad clínica y preclínica que la administración de ACC resultó en una mejora de la biodisponibilidad del calcio (Meiron et al., J Bone Miner Res. 2011, 26(2):364-72, Shaltiel et al., Health 5, 2013, 18-29, y Vaisman et al., Journal of Bone and Mineral Research, 2014, 29 (10), pp 2203-2209), un efecto que es especialmente importante para aliviar las afecciones y trastornos relacionados con la malabsorción de calcio. La administración oral de ACC condujo a un efecto positivo sobre los parámetros óseos, demostrado por la acción antirresortiva, los efectos anabólicos y el mantenimiento de la fuerza mecánica ósea en un modelo de prevención de la osteoporosis (Shaltiel et al.). El documento WO 2013/088440 describe composiciones de carbonato de calcio amorfo para usar en el tratamiento de malabsorción de calcio y trastornos, enfermedades y afecciones asociados a la malabsorción, y para aumentar la densidad mineral ósea en trastornos de malabsorción de calcio y asociados al metabolismo óseo.

[0003] El documento WO 2005/115414 describe composiciones administrables por vía oral que comprenden ACC estable, así como un método para tratar la osteoporosis, la osteomalacia y enfermedades relacionadas. El documento WO 2008/041236 describe formulaciones que contienen carbonato de calcio amorfo o microcristalino que son eficaces en el tratamiento de diversas afecciones patológicas, incluidas enfermedades proliferativas, trastornos neurológicos y trastornos musculoesqueléticos. El documento WO 2009/053967 describe composiciones que contienen carbonato de calcio amorfo (ACC) y al menos un aminoácido fosforilado o un péptido fosforilado. Dichas composiciones se pueden usar para el tratamiento de diversas enfermedades enumeradas en el mismo.

[0004] Las lesiones nerviosas son comunes en la práctica clínica. Hay muchos ejemplos en los que el daño del nervio periférico, causado por un accidente o similar, no puede restaurarse por completo. También hay muchos ejemplos clínicos en los que debe extirparse un nervio periférico como resultado de operaciones quirúrgicas en general. Mientras que el sistema nervioso central (SNC) tiene una autoreparación larga y débil de fibra nerviosa, el sistema nervioso periférico (SNP) tiene la capacidad de reparación nerviosa mediante una rápida regeneración de fibra nerviosa. Los estudios sobre la recuperación de la funcionalidad del SNP después de una lesión se han convertido en un campo de rápido crecimiento dedicado a la búsqueda de formas adecuadas para facilitar y guiar la regeneración axonal.

[0005] Se han desarrollado varios enfoques en un intento de regenerar los nervios periféricos lesionados. Una de tales técnicas implica la sutura real de los extremos proximal y distal del nervio cortado. Se ha buscado activamente el uso de varios conductos, suturados entre los muñones nerviosos proximal y distal, para la guía de los axones regenerados cortados.

[0006] Otras enfermedades que actualmente carecen de tratamiento suficiente se relacionan con una distrofia muscular. La distrofia muscular es un grupo de enfermedades musculares que debilitan el sistema musculoesquelético y dificultan la locomoción. Las distrofias musculares se caracterizan por debilidad progresiva del músculo esquelético, defectos en las proteínas musculares y muerte de las células y el tejido muscular. Una de esas enfermedades es la distrofia muscular de Duchenne (DMD), una enfermedad letal de desgaste muscular que afecta aproximadamente a uno de cada 3500 niños. Los niños con Duchenne tienen una expectativa de vida limitada de aproximadamente 20 años. El trastorno es causado por una mutación en el gen de la distrofina; Se han identificado muchas mutaciones diferentes que conducen a la disfunción de la proteína distrofina. Se caracteriza por desgaste y degeneración progresiva del músculo esquelético (Shin et al., Int J Biochem Cell Biol. 2013, 45(10):2266-79), que también implica una homeostasis anormal del calcio. El manejo médico de las distrofias musculares ha incluido el uso de corticoides; sin embargo, a pesar de sus considerables efectos beneficiosos, el tratamiento prolongado con corticoides puede provocar osteoporosis. Incluso sin corticosteroides, la distrofia muscular de Duchenne conduce a una movilidad reducida, que se asocia per se con una mayor posibilidad de fracturas y una densidad mineral ósea reducida (Nanette et al., Phys MedRehabil Clin N Am. 2012, 23(4):773-99).

[0007] Bentov et al. (Shmuel Bentov y otros, Journal of Structural Biology 171 (2010) 207-215) muestran que la matriz orgánica extracelular extraída de gasteros del cangrejo de río de pinza roja induce la formación estable de ACC in vitro. La fracción proteica de esta matriz orgánica está altamente fosforilada y se incorpora a la fase mineral ACC durante la precipitación. Los autores afirman que las fosfoproteínas juegan un papel importante en el control de la formación y estabilización de ACC y sus restos de fosfoaminoácidos son componentes clave en este proceso.

[0008] WO 2014/122658 A1 describe métodos para acelerar el crecimiento óseo en un sujeto que tiene una condición ósea, seleccionados del grupo que consiste en una fractura por fuerza externa, fractura patológica, fractura por fatiga,

osteogénesis por distracción, osteotomía, osteointegración y combinaciones de los mismos, empleando la administración de una composición que contiene carbonato de calcio amorfo estable, que comprende al menos un estabilizador. Además se proporcionan las composiciones farmacéuticas administrables por vía oral para usar en la aceleración del crecimiento óseo en dichas condiciones óseas.

[0009] Actualmente, no existe un tratamiento satisfactorio para la DMD o para la lesión nerviosa, y la reducción de la gravedad de los síntomas y la mejora de la calidad de vida del paciente que padece estas afecciones puede considerarse un logro.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] Sorprendentemente, se ha descubierto que el carbonato de calcio amorfo (ACC) puede mejorar positivamente la regeneración, el desarrollo, la maduración y la diferenciación de las células. En parte, esta invención se basa en los descubrimientos inesperados de que la ACC acelera la regeneración de las fibras nerviosas y promueve la formación de miotubos.

[0011] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende carbonato de calcio amorfo (ACC) estabilizado por al menos un agente estabilizador, para usar en el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada de una distrofia muscular y un defecto axonal. De acuerdo con algunas formas de realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de un defecto axonal, por ejemplo, daño axonal. De acuerdo con otra forma de realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de una distrofia muscular tal como la distrofia muscular de Duchenne. Esta descripción también se refiere a un método para tratar una enfermedad o condición seleccionada de una distrofia muscular y un defecto axonal y en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a dicho sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende carbonato de calcio amorfo (ACC) estabilizado por al menos un agente estabilizador.

[0012] De acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, el ACC está estabilizado por al menos un agente estabilizante. Según una forma de realización, el agente estabilizante se selecciona de polifosfato, aminoácidos fosforilados, ácidos orgánicos, compuestos orgánicos fosforilados, fosfonados, sulfatados o sulfonados, ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos, bisfosfonatos, sacáridos y derivados de los mismos, proteínas, proteínas fosforiladas, biopolímeros naturales y sintéticos y sus derivados, y cualquier combinación de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0013]

La Fig. 1 muestra el efecto de diferentes fuentes de calcio en el brote neuronal de cortes de ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal cultivados (SC-DRG). Tinción inmunofluorescente (anticuerpo anti neurofilamento) de fibras nerviosas cultivadas a partir de cortes de SCDRG expuestos a los siguientes compuestos de calcio [concentración de Ca^{2+} de 2 mM]: (A) ácido ACC-etidróico; (B) ACC-fosfoserina; (C) gastrolito; (D) carbonato de calcio cristalino (CCC); y (E) solución de CaCl_2 (control). Ampliación original 3100.

La Fig. 2 muestra el efecto de (A) ACC estabilizado con ácido etidróico y (B) solución de CaCl_2 (control) sobre el brote neuronal de células cerebrales cultivadas en microportadores de quitosano (MC). Se presenta la tinción inmunofluorescente de fibras nerviosas (anticuerpo anti neurofilamento) cultivadas a partir de agregados de MC de quitosano de células cerebrales, después de 30 días de cultivo en presencia de 2 mM de ácido ACC-etidróico o CaCl_2 .

La Fig. 3 muestra el efecto de ACC sobre la formación de miotubos en cultivos de músculo esquelético sano. Aumento original x40. Los cultivos de músculo esquelético se expusieron a los siguientes compuestos de calcio (concentración final de Ca^{2+} de 2 mM): ácido ACC-etidróico; ACC-ADP; gastrolito; carbonato de calcio cristalino (CCC); y solución de CaCl_2 (control). Los cultivos se fijaron después de 4 y 7 días y se tiñeron con Giemsa. Se observó una mejora de la formación de miotubos por cultivos de músculo esquelético en células tratadas con ACC.

La Fig. 4 muestra el efecto de ACC en el medio de cultivo sobre la formación temprana de miotubos en cultivos de líneas celulares *mdx*. Se muestra la tinción de Giemsa de los cultivos que se expusieron a un medio que contenía CaCl_2 , ACC-ET y ACC-fosfoserina (ACC-PS). Ampliación original x100.

La Fig. 5 muestra los niveles de creatinina quinasa (CK) medidos en la línea de células musculares *mdx* expuestas a dos preparaciones de ACC (ACC-ET y ACC-PS) frente a CaCl_2 .

La Fig. 6 muestra el efecto de ACC (ACC-PS, ACC-PP frente a control (CaCl_2)) sobre la formación de miotubos en cultivos primarios de ratones *mdx* (tinción de Giemsa; aumento original X50).

La Fig. 7 muestra el efecto de ACC sobre la formación de miotubos en cultivos primarios de ratones *mdx* demostrado por inmunotinción de miosina; control (CaCl_2); ACC-PS, ACC-polifosfato (ACC-PP). Ampliación original X100.

La Fig. 8 muestra los valores de creatinina quinasa de ratones (ratones de tipo salvaje y *mdx*) a los que se les administró por vía oral diferentes tipos de suplementos de calcio.

La Fig. 9 muestra el efecto de la administración de ratones ACC mdx estabilizados sobre su rendimiento en la prueba de suspensión de cuatro extremidades.

La Fig. 10 (no según la invención) muestra el efecto de ACC estabilizado sobre el desarrollo de embriones de ratón in vitro en un medio de una etapa con diferente concentración de ACC.

La Fig. 11 (no según la invención) muestra el efecto de ACC estabilizado sobre el desarrollo de embriones de ratón in vitro en medio de un solo paso.

La Fig. 12 (no según la invención) muestra el efecto de ACC estabilizado sobre el desarrollo de embriones de ratón in vitro en medio de escisión.

La Fig. 13 muestra la tinción con rojo de alizarina de osteoblastos después de 10 días de cultivo en función de diversos tratamientos con medios. El medio se complementó con Ca^{2+} 1 mM adicional de: **A** - ACC, **B** - CaCl_2 o **C** - control, sin adición de Ca^{2+} .

La Fig. 14 muestra la tinción con fosfatasa alcalina de osteoblastos después de 10 días de cultivo en función de diversos tratamientos con medios. El medio se complementó con Ca^{2+} 1 mM adicional de: **A** - ACC, **B** - CaCl_2 o **C** - control, sin adición de Ca^{2+} .

La Fig. 15 muestra la tinción con rojo de alizarina (**A-C**) y la fosfatasa alcalina (**D-F**) de líneas celulares mdx cultivadas en medios con diferentes fuentes de Ca^{2+} 1 mM adicional añadido: **A** y **D** - ACC, **B** y **E** - CaCl_2 , o **C** y **F** - control, sin adición de Ca^{2+} .

La Fig. 16 (no según la invención) muestra el efecto de ACC estabilizado de ovarios cultivados in vitro (**A**) en los que las células de la granulosa que rodeaban a los ovocitos estaban intactas frente al control (**B**) (sin ACC en el medio) en el que las células de la granulosa no intactas y Se observó ovocito en etapa de Vesículas Germinales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0014] La presente invención describe las ventajas inesperadas de ACC sobre el crecimiento y la maduración celular. Estos atributos se observaron en varios sistemas de crecimiento celular como se ejemplifica a continuación.

[0015] De acuerdo con algunos aspectos particulares, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende carbonato de calcio amorfo (ACC) estabilizado por al menos un agente estabilizante, para usar en el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada de una enfermedad o condición neuromuscular. En formas de realización particulares, la enfermedad puede seleccionarse de distrofia muscular y un defecto axonal.

[0016] Para cada aspecto de la presente invención, individual y colectivamente, se utiliza la siguiente terminología y los parámetros específicos se definen a continuación:

[0017] Los términos "composición farmacéutica" y "composición farmacéuticamente aceptable" se usan en este documento de manera intercambiable y se refieren a una composición que comprende ACC estabilizado por al menos un estabilizador, como se describe a continuación, formulado junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0018] Los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, conservantes, antioxidantes, recubrimientos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tensioactivos, tampones y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones pueden contener otros agentes activos que proporcionen funciones terapéuticas suplementarias, adicionales o mejoradas.

[0019] De acuerdo con algunas formas de realización, la enfermedad o condición es un defecto axonal, por lo que la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende ACC estabilizada por al menos un agente estabilizante, para usar en el tratamiento de un defecto axonal.

[0020] El término "tratar", como se usa en el presente documento, se refiere a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio o mejora de uno o más síntomas asociados con una afección.

ACC estabilizado:

[0021] De acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, el ACC se estabiliza mediante al menos un agente estabilizador. Los términos "carbonato de calcio amorfo" y "ACC" se usan en este documento de manera intercambiable y se refieren a una forma amorfa no cristalina de carbonato de calcio estabilizado por al menos un agente estabilizante. Los términos "agente estabilizante" y "estabilizador" se usan en este documento indistintamente y se refieren a cualquier sustancia que contribuya a conservar el carbonato de calcio en estado amorfo durante la producción, formulación, almacenamiento y/o uso de ACC. En ciertas formas de realización, el agente estabilizador es un agente único. En otras formas de realización, se abarca el uso de varios agentes estabilizadores. Los términos "ACC estabilizado" y "ACC estabilizado por al menos un estabilizador" pueden usarse en algunas formas de realización, indistintamente.

[0022] El ACC puede obtenerse de una fuente natural o sintetizarse químicamente. Los términos también incluyen ACC estabilizado de forma natural, como ACC obtenido a partir de gastrolitos.

[0023] El término "ACC natural", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ACC aislado o derivado de una fuente natural. Los ejemplos no limitantes de fuentes naturales de ACC incluyen gastrolitos de crustáceos de agua dulce.

[0024] El término "ACC sintético", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ACC producido y/o derivado por el hombre ex-vivo.

[0025] El estabilizador puede comprender una molécula que tiene uno o más grupos funcionales seleccionados de, entre otros, grupos hidroxilo, carboxilo, éster, amina, fosfino, fosfono, fosfato, sulfonilo, sulfato o sulfino. Los compuestos portadores de hidroxilo, combinados con el hidróxido, también tienen opcionalmente otras funciones como carboxilo, etc. pero sin que el hidroxilo esté esterificado.

[0026] De acuerdo con algunas formas de realización, el estabilizador tiene baja toxicidad o no tiene toxicidad para células u organismos de mamíferos, y en particular para un ser humano. Según otras formas de realización, el estabilizante es de grado alimentario, nutracéutico o farmacéutico.

[0027] En ciertas formas de realización, el agente estabilizador de ACC es independientemente en cada caso, un ácido orgánico; compuesto orgánico fosforilado, fosfonado, sulfatado o sulfonado; éster fosfórico o sulfúrico de un ácido hidroxicarboxílico; un compuesto de organoamina; un compuesto orgánico que comprende un hidroxilo; un compuesto organofosforado o una sal del mismo; aminoácidos fosforilados y derivados de los mismos, un bisfosfonato; un compuesto organofosforado; un compuesto de organofosfonato; polifosfato orgánico, un polifosfato inorgánico, un ácido fosforoso inorgánico, un compuesto orgánico que tiene múltiples grupos funcionales como se define anteriormente; un compuesto inorgánico de fosfato y polifosfato; un compuesto orgánico que tiene una cadena de polifosfato; un tensoactivo orgánico; un ion inorgánico bioesencial; sacáridos y derivados de los mismos, proteínas, proteínas fosforiladas, biopolímeros naturales y sintéticos y derivados de los mismos o cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con algunas formas de realización, el estabilizador también puede tener una actividad farmacéutica, por ejemplo, bisfosfonato o ATP.

[0028] Así, en una forma de realización, el agente estabilizador se selecciona del grupo que consiste en polifosfato tal como polifosfato inorgánico, ácidos orgánicos, compuestos orgánicos fosforilados, fosfonados, sulfatados o sulfonados, ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos, aminoácidos fosforilados, bisfosfonatos, compuestos orgánicos polifosfato, sacáridos y derivados de los mismos, proteínas, péptidos, proteínas fosforiladas, péptidos fosforilados y cualquier combinación de los mismos. Según otra forma de realización, el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en fosfoserina, adenosina trifosfato, adenosina difosfato, ácido fítico, ácido cítrico, ácido etidrónico, pirofosfato, polifosfato, trifosfato, etanol, hexametrafosfato, quitina y cualquier combinación de los mismos.

[0029] Según algunas formas de realización, el estabilizador es un ácido orgánico. De acuerdo con ciertas formas de realización, el ácido orgánico se selecciona de ácido ascórbico, cítrico, láctico o acético, ácido oxálico, ácido malónico, ácido glutacónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido láctico, ácido glutámico, ácido aconítico, y opcionalmente incluyen compuestos que tienen al menos al menos dos grupos carboxílicos opcionalmente de peso molecular no superior a 250 g/mol, tales como ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico, etc. Según una forma de realización particular, el estabilizador es el ácido cítrico

[0030] En otra forma de realización, el estabilizador es un éster fosfórico de ácidos hidroxicarboxílicos como el fosfoenolpiruvato. En otra forma de realización, los ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos comprenden aminoácidos. Ejemplos de tales ésteres son fosfoserina, fosfotreonina, sulfoserina, sulfotreonina y fosfocreatina.

[0031] En otra forma de realización, el estabilizador es un sacárido. De acuerdo con una forma de realización, los sacáridos se seleccionan de mono-, di-, tri-, oligo- y polisacáridos como sacarosa, manosa, glucosa, quitosano y quitina. El estabilizador puede ser, en algunas formas de realización, un poliol tal como glicerol. Según otra forma de realización, el estabilizador es un aminoácido como la serina o la treonina. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

[0032] Los ejemplos no limitantes de biopolímeros y derivados naturales y sintéticos son polinucleótidos y glicoproteínas.

[0033] Algunos ejemplos ilimitados específicos de tales estabilizadores de ACC que fueron aprobados para el consumo alimentario, que se encuentran en alimentos naturales o en seres humanos incluyen ácido fítico, ácido cítrico, pirofosfato de sodio dibásico, adenosina 5'-monofosfato (AMP) sal de sodio, adenosina 5'-difosfato (ADP) sal de sodio y adenosina 5'-trifosfato (ATP) sal disódica hidratada, fosfoserina, aminoácidos fosforilados, tensoactivos de calidad alimentaria, estearoil lactilato de sodio y combinaciones de los mismos.

5 **[0034]** Según algunas formas de realización, el estabilizador comprende al menos un componente seleccionado entre ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos, tales como fosfoenolpiruvato, fosfoserina, fosfotreonina, sulfoserina o sulfotreonina y sacáridos, seleccionados entre mono-, di-, tri-, oligo- y polisacáridos, por ejemplo, sacarosa, manosa, glucosa. El compuesto portador de hidroxilo puede comprender además al menos un hidróxido alcalino, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y similares. Los ácidos fosforilados pueden estar presentes en oligopéptidos y polipéptidos. En otras formas de realización de la invención, el estabilizador es un ácido orgánico seleccionado de ácido monocarboxílico o ácido carboxílico múltiple, por ejemplo, ácido dicarboxílico o ácido tricarboxílico. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la invención. El ácido orgánico puede ser como se define anteriormente.

10 **[0035]** En algunas formas de realización de la invención, el estabilizador de ACC se selecciona de aminoácidos fosforilados, polioles y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, el ACC estable comprende un compuesto fosforilado como estabilizador en el que la fosforilación se realiza en el grupo hidroxilo de un compuesto orgánico. En algunas formas de realización, el ACC estable comprende un estabilizador seleccionado del grupo que
15 consiste en ácido cítrico, fosfoserina, fosfotreonina y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de estabilizadores que contienen grupos fosfato, fosfito, fosfonato y sales o ésteres de los mismos incluyen ácido fítico, fosfato de dimetilo, fosfato de trimetilo, pirofosfato de sodio, pirofosfato de tetraetilo, bisfosfato de ribulosa, ácido etidrónico y otros bisfosfonatos médicos, sal del ácido 3-fosfoglicérico, gliceraldehído 3-fosfato, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sal
20 sódica, dietilentriamina pentakis(ácido metilfosfónico), nitrilotri(ácido metilfosfónico), 5-fosfo-D-ribosa 1-difosfato sal pentasódica, adenosina 5'-difosfato sal sódica, adenosina 5'-trifosfato sal disódica hidratada, α -D-galactosamina 1-fosfato, 2-fosfol-ácido ascórbico sal trisódica, α -D-galactosa 1-fosfato sal dipotásica pentahidratada, α -D-galactosamina 1-fosfato, O-fosforiletanolamina, sal disódica hidratada, ácido 2,3-difosfo-D-glicérico sal pentasódica, ácido fosfo(enol)pirúvico sal monosódica hidratada, D-gliceraldehído 3-fosfato, *sn*-glicerol 3-fosfato de litio sal, sal disódica del ácido D-(-)-3-fosfoglicérico, sal sódica de D-glucosa 6-fosfato, ácido fosfatídico, sal sódica de ibandronato, ácido fosfonoacético, ácido
25 DL-2-amino-3-fosfonopropiónico o combinaciones de los mismos. Los iones inorgánicos bioesenciales pueden incluir, entre otros, Na, K, Mg, Zn, Fe, P, S, N; P o S en fase de óxidos; o N como grupos amoniaco o nitro.

30 **[0036]** El estabilizador puede incluir además compuestos de fosfonato tales como, entre otros, bisfosfonatos, polifosfatos, como, entre otros, pirofosfato o polifosfonatos u organopolifosfatos, como, entre otros, adenosina difosfato (ADP) o adenosina trifosfato (ATP).

[0037] Opcionalmente, el ACC se estabiliza mediante una combinación de fosfoserina y ácido cítrico. En otra forma de realización, el ACC se estabiliza con trifosfato y ácido cítrico.

35 **[0038]** El ACC puede estar estabilizado por más de un estabilizador, por ejemplo, dos estabilizadores. En algunas formas de realización, el primer estabilizador y el segundo estabilizador son similares. En otras formas de realización, el primer estabilizador y el segundo estabilizador comprenden diferentes estabilizadores. Los estabilizadores primero y segundo pueden ser cada uno independientemente como se ha definido anteriormente. El ACC estable puede comprender más de dos estabilizadores, pudiendo ser los estabilizadores iguales o diferentes. El ACC estable puede comprender más de dos estabilizadores, en el que se añaden uno o más estabilizadores al ACC durante la formación y precipitación del
40 ACC; constituyendo por lo tanto estabilizadores "internos", y se añaden uno o más estabilizadores en las superficies de las partículas ACC después de su formación; por lo tanto, constituyen estabilizadores "externos". Se pueden encontrar más ejemplos de ACC estable y su preparación en las solicitudes de patentes internacionales números WO 2009/053967, WO 2014/024191 y WO 2016/193982.

45 **[0039]** En algunas formas de realización, el agente estabilizador es una proteína o un péptido. En una forma de realización, la proteína o el péptido es una proteína o un péptido naturalmente producido y purificado. En otra forma de realización, la proteína es proteína producida sintéticamente. En algunas formas de realización, la proteína se selecciona de las proteínas GAP65, GAP22, GAP21 y GAP12. En otra forma de realización, las proteínas se seleccionan de CqCDA1, cotinasa 2, beta-N-acetilglucosaminidasa, proteína de unión a quitina similar a GAMP, CqCBP, CAP10, GAP 18.2, GAP
50 02526, CqHc1, CqHc2, CqHc3, CqHc4, CqHc5, CqHc6, CqHc7, criptocianina 1, ciclofilina, cistatina 1, cistatina 2, LPS-BP, proteína LEA y cristalocianina, opcionalmente dichas proteínas se originan a partir de *C. quadricarinatus*. De acuerdo con ciertas formas de realización, las proteínas son proteínas fosforiladas

55 **[0040]** En algunas formas de realización, el agente estabilizador se selecciona de polifosfato, aminoácidos fosforilados, ácidos orgánicos, compuestos orgánicos fosforilados, fosfonados, sulfatados o sulfonados, ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos, bifosfonatos, sacáridos, derivados de los mismos, proteínas, proteínas fosforiladas, biopolímeros naturales y sintéticos y sus derivados y cualquier combinación de los mismos. En otras formas de realización, el agente estabilizador se selecciona de fosfoserina, trifosfato, adenosina trifosfato, adenosina difosfato, ácido fítico, ácido cítrico, ácido etidrónico, pirofosfato, etanol, hexametáfosfato, quitina y cualquier combinación de los mismos.

60 **[0041]** En algunas formas de realización, el agente estabilizador se selecciona de ácidos orgánicos, ácidos orgánicos fosforilados, ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos, aminoácidos fosforilados, bifosfonatos, polifosfatos orgánicos, sacáridos, derivados de los mismos, proteínas y cualquier combinación de los mismos.

65

[0042] De acuerdo con algunas formas de realización, el al menos un estabilizador se selecciona del grupo que consiste en un polifosfato, bisfosfonato, aminoácido fosforilado, ácido cítrico y cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, se añaden más de un estabilizador, por ejemplo, 2, 3 o 4 estabilizadores.

5 **[0043]** Según algunas formas de realización, el estabilizador es un polifosfato o sus sales farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con algunas formas de realización, el polifosfato es una sal de polifosfato soluble en agua, fisiológicamente compatible, seleccionada del grupo que consiste en sodio, potasio y cualquier otro catión esencial de polifosfato. En una forma de realización, el polifosfato es un polifosfato orgánico o inorgánico. El término "polifosfato", como se usa en este documento, se refiere a ésteres poliméricos de PO_4 . De acuerdo con algunas formas de realización, el polifosfato es una sal de polifosfato soluble en agua fisiológicamente compatible seleccionada del grupo que consiste en polifosfato de sodio y potasio. En algunas formas de realización, el polifosfato es un polifosfato inorgánico o sus sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitantes de dicha sal son Na, K, Mg, Mn y Zn. Según algunas formas de realización, el fosfato inorgánico comprende de 2 a 10 grupos fosfato, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 grupos fosfato. Según algunas formas de realización, el polifosfato se selecciona de pirofosfato, trifosfato y hexametrafosfato. De acuerdo con una forma de realización, el estabilizador es pirofosfato o sales farmacéuticamente aceptables del mismo tales como pirofosfato de sodio. De acuerdo con otra forma de realización, el estabilizador es trifosfato o sales farmacéuticamente aceptables del mismo tales como trifosfato de sodio. Los términos "trifosfato" y "tripolifosfato" se usan en este documento de manera intercambiable. De acuerdo con una forma de realización adicional, el estabilizador es hexametrafosfato o una de sus sales farmacéuticamente aceptables tal como hexametrafosfato de sodio.

20 **[0044]** Según algunas formas de realización, el estabilizador es un bisfosfonato o sus sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitativos de sal son Na, K, Mg, Mn y Zn.

25 **[0045]** El término "bisfosfonato", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos que tienen dos grupos fosfonato ($\text{PO}(\text{OH})_2$). El término se refiere además a compuestos que tienen un esqueleto de $\text{PO}_3\text{-PO}_3$ orgánico. El más típico es una serie de bisfosfonatos que se utilizan como productos farmacéuticos para tratar la osteoporosis. De acuerdo con algunas formas de realización, el bisfosfonato se selecciona del grupo que consiste en ácido etidrónico, ácido zoledrónico, ácido medronico, ácido alendrónico y una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Según algunas formas de realización, el estabilizador es un ácido etidrónico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con otra forma de realización, el estabilizador es un ácido zoledrónico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con una forma de realización adicional, el estabilizador es un ácido medrónico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con ciertas formas de realización, el estabilizador es ácido alendrónico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

35 **[0046]** Según ciertas formas de realización, el estabilizador es un aminoácido fosforilado. De acuerdo con una forma de realización, el aminoácido fosforilado es fosfoserina. Según otra forma de realización, el aminoácido fosforilado es la fosfotreonina.

40 **[0047]** Según algunas formas de realización, la composición de ACC comprende una combinación de los estabilizadores descritos anteriormente.

45 **[0048]** Según algunas formas de realización, el estabilizador es un polifosfato o un bisfosfonato como se ha definido anteriormente, y la relación molar entre los átomos de P del estabilizador y los átomos de Ca del ACC (relación molar P:Ca) es de aproximadamente 1:90 a 1:1. En una forma de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:40 a aproximadamente 1:1. En otra forma de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:35 a aproximadamente 1:2. En determinadas formas de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:3. En determinadas formas de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:28 a aproximadamente 1:3. En otras formas de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:4. En otra forma de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:5. En otra forma de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:6. En una forma de realización particular, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 1:5. En otra forma de realización particular, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:5. Según algunas formas de realización, dicho polifosfato es pirofosfato, trifosfato, hexametrafosfato o una de sus sales farmacéuticamente aceptable. Según otras formas de realización, el bisfosfonato es ácido alendrónico, ácido etidrónico, ácido zoledrónico o ácido medronico y la relación molar P:Ca es como se ha definido anteriormente.

60 **[0049]** De acuerdo con algunas formas de realización, el contenido de calcio (contenido de Ca) el ACC estabilizado que comprende polifosfato o bisfosfonato es de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 39 % en peso, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 39 % en peso, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 39 % en peso, aproximadamente 15 % a aproximadamente 39% en peso, aproximadamente 20% en peso a aproximadamente 38% en peso, aproximadamente 25% en peso a aproximadamente 38% en peso, o aproximadamente 30 a aproximadamente 38. Los términos "contenido de Ca" y "contenido de calcio" se usan en este documento de manera intercambiable y referirse al contenido de calcio de la ACC en la composición final.

65

5 **[0050]** En determinadas formas de realización, la relación molar P:Ca es de aproximadamente 1:40 a aproximadamente 1:1, y el contenido de Ca es de aproximadamente el 20 % en peso a aproximadamente el 39 % en peso. En algunas formas de realización, la relación molar es de 1:28 a aproximadamente 1:3, y el contenido de Ca es de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 38 % en peso. En otra forma de realización, la relación molar es de 1:25 a aproximadamente 1:5, y el contenido de Ca es de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 36 % en peso.

10 **[0051]** De acuerdo con algunas formas de realización, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en un polifosfato, aminoácido fosforilado, bisfosfonato, ácido cítrico, ácido tartárico y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con una forma de realización, el polifosfato se selecciona del grupo que consiste en trifosfato, pirofosfato y hexametáfosfato, el aminoácido fosforilado es fosfoserina o fosfotreonina, y el bisfosfonato se selecciona del grupo que consiste en alendronato, ácido etidrónico, ácido zoledrónico y ácido medronico.

15 **[0052]** De acuerdo con algunas formas de realización, el ACC estabilizado comprende menos del 20 % en peso, menos del 15 % en peso, menos del 10 % en peso o menos del 5 % en peso del agente estabilizante. En algunas formas de realización, el ACC estabilizado comprende hasta el 5 % en peso del agente estabilizador.

20 **[0053]** De acuerdo con una forma de realización, el diámetro medio de las partículas primarias de ACC estabilizadas es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 5 µm. De acuerdo con otra forma de realización, el diámetro promedio de las partículas primarias de ACC es de alrededor de 30 nm a alrededor de 400 nm. De acuerdo con otra forma de realización más, el diámetro promedio del diámetro promedio de las partículas primarias de ACC es de aproximadamente 30 nm a 350 nm. De acuerdo con ciertas formas de realización, el diámetro promedio de las partículas primarias de ACC es de aproximadamente 35 nm a 300 nm, de 40 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 45 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm o de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm. Según otra forma de realización más, el diámetro medio de las partículas primarias de ACC es de aproximadamente 30 nm a 00 nm. Según todavía otra forma de realización, las partículas primarias de ACC se agregan y el diámetro medio de los agregados está entre 0,5 µm y 300 µm. De acuerdo con una forma de realización adicional, el diámetro de los agregados de la partícula primaria de ACC es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µm o de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 µm. Según otra forma de realización, el diámetro medio de los agregados de la partícula primaria ACC está comprendido entre 1 µm y 10 µm.

Composiciones farmacéuticas y Vías de administración:

35 **[0054]** La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por cualquier vía de administración conocida. El término "administrar" o "administración de" una sustancia, un compuesto, un agente o una composición farmacéutica a un sujeto puede llevarse a cabo usando uno de una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un compuesto, un agente o una composición pueden administrarse por vía enteral o parenteral. Enteralmente se refiere a la administración a través del tracto gastrointestinal incluyendo por vía oral, sublingual o rectal. La administración parenteral incluye la administración por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, ocular, sublingual, intranasal, por inhalación, intraespinal, intracerebral y transdérmica (por absorción, por ejemplo, a través de un conducto cutáneo). Un compuesto o agente también puede introducirse apropiadamente mediante dispositivos poliméricos recargables o biodegradables u otros dispositivos, por ejemplo, parches y bombas, o formulaciones, que proporcionan la liberación prolongada, lenta o controlada del compuesto o agente. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados. La administración puede incluir tanto la administración directa, incluida la autoadministración, como la administración indirecta, incluido el acto de recetar un medicamento o un alimento médico. Por ejemplo, como se usa aquí, un médico que instruye **9** que un paciente se autoadministre un fármaco o un alimento médico, o que otro le administre el fármaco o el alimento médico y/o que proporcione a un paciente una receta para un fármaco o un alimento médico está administrando el fármaco o el alimento médico comida al paciente. Según algunas formas de realización, la composición farmacéutica es un alimento o complemento alimenticio farmacéutico.

50 **[0055]** La composición farmacéutica que comprende ACC estabilizado puede administrarse mediante una administración sistémica. Por ejemplo, el ACC estabilizado se puede administrar por vía oral, sublingual o rectal. Alternativamente, el ACC estabilizado puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, ocular, sublingual, intranasal, por inhalación, intraespinal, intracerebral y transdérmica.

60 **[0056]** La composición farmacéutica según la presente invención se puede preparar por cualquier método conocido. En particular, la composición farmacéutica se puede formular utilizando un método conocido en la técnica para proporcionar una liberación rápida, continua o retardada del ingrediente activo después de la administración. En una forma de realización particular, la composición farmacéutica se formula como una forma farmacéutica sólida seleccionada entre comprimidos, cápsulas, polvo o gránulos. En otra forma de realización, la composición farmacéutica se formula como una forma de dosificación líquida o semilíquida seleccionada de un elixir, tintura, suspensión, jarabe, emulsión o gel. La composición farmacéutica se puede formular como formulaciones semisólidas tales como goma de mascar.

65

5 [0057] Las composiciones farmacéuticas destinadas al uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y además pueden comprender uno o más agentes seleccionados entre edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes para proporcionar productos farmacéuticamente elegantes y preparaciones sabrosas. Los comprimidos contienen el principio activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz o ácido alginico; aglutinantes; y agentes lubricantes. Los comprimidos se recubren opcionalmente utilizando técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una liberación prolongada del fármaco durante un período más prolongado.

Enfermedades o condiciones neuromusculares:

15 [0058] De acuerdo con una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende carbonato de calcio amorfo (ACC) estabilizado por al menos un agente estabilizante, para usar en el tratamiento de un defecto axonal.

20 [0059] El término "defecto axonal" se refiere a cualquier defecto, daño o lesión en la parte axonal de una célula nerviosa del sistema nervioso periférico o central. Los nervios pueden dañarse ya sea por trauma o enfermedad. La lesión nerviosa traumática, como el síndrome del túnel carpiano, es causada por la compresión de los nervios. Otros traumatismos, como caídas y accidentes automovilísticos, pueden provocar la ruptura de los nervios. Las enfermedades que dañan los nervios incluyen la esclerosis múltiple, la diabetes, la espina bífida y la poliomielitis. La esclerosis múltiple, por ejemplo, provoca la descomposición de los axones que rodean la mielina aislante. De acuerdo con algunas formas de realización de la invención, el defecto o daño puede ocurrir en el cerebro, la médula espinal, los nervios aferentes y eferentes que emergen de la médula espinal y en los nervios periféricos.

30 [0060] El tratamiento de los defectos axonales puede comprender el tratamiento del daño axonal tal como una lesión. El tratamiento del daño axonal también puede comprender potenciar la regeneración y/o recuperación de un nervio dañado. El tratamiento del daño axonal aún puede comprender mejorar la regeneración nerviosa. El tratamiento del defecto axonal puede comprender además el tratamiento de un defecto resultante de una enfermedad tal como la esclerosis múltiple.

35 [0061] De acuerdo con algunas formas de realización, el defecto axonal es un daño axonal, por lo que la composición farmacéutica de la presente invención se usa para tratar un daño axonal, por ejemplo, una lesión axonal.

[0062] El tratamiento del daño axonal puede comprender potenciar la regeneración y/o recuperación de un nervio dañado.

40 [0063] Los términos "regeneración neuronal" y "regeneración de nervios" como se usan en este documento pueden usarse indistintamente y referirse a la recuperación de funciones de un nervio dañado. Específicamente, incluye la recuperación de la señalización a través del nervio mediante la reparación de un sitio dañado, el nuevo crecimiento de las fibras neuronales axonales y dendríticas del sistema nervioso periférico o central. En algunas formas de realización, la regeneración nerviosa se refiere al brote de fibras neuronales dañadas.

45 [0064] De acuerdo con algunas formas de realización, la composición farmacéutica administrada localmente se formula en una formulación líquida o semilíquida como se define anteriormente en el presente documento. En una forma de realización, la formulación líquida o semilíquida se selecciona de una suspensión, emulsión, coloide o gel. El ACC estabilizado puede administrarse como suspensión.

50 [0065] El defecto del nervio dañado puede ser un nervio del sistema nervioso periférico (SNP) o del sistema nervioso central (SNC). Así, en una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención es para tratar un daño a los nervios del sistema nervioso central. De acuerdo con otra forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención es para tratar un daño en el sistema nervioso periférico. De acuerdo con algunas formas de realización de la invención, la composición farmacéutica de la presente invención es para tratar un daño ocurrido en el cerebro, la médula espinal, el nervio aferente y eferente que emerge de la médula espinal, o en los nervios periféricos.

55 [0066] La composición farmacéutica se puede administrar localmente. La composición farmacéutica puede administrarse cerca del nervio dañado. La composición farmacéutica también puede administrarse por inyección, infusión o mediante una bomba.

60 [0067] Según una forma de realización, la composición farmacéutica que comprende ACC estabilizado por al menos un agente estabilizante se selecciona de fosfoserina, trifosfato, adenosina trifosfato, adenosina difosfato, ácido fólico, ácido cítrico, ácido etidróico, pirofosfato, etanol, hexametáfosfato, quitina y cualquier combinación de los mismos, para uso en el tratamiento de un defecto axonal tal como daño axonal.

65

[0068] Según algunas formas de realización, la enfermedad o trastorno es una distrofia muscular. Por tanto, en una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéuticamente aceptable que comprende ACC estabilizado, para usar en el tratamiento de una distrofia muscular.

5 [0069] El término "distrofia muscular", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de varios trastornos, enfermedades o condiciones degenerativas caracterizadas por debilidad y fragilidad progresivas del músculo esquelético. Muchas de estas enfermedades resultan de mutaciones en genes que codifican proteínas del complejo distrofina-glucoproteína (DGC). En una forma de realización, distrofia muscular se refiere a una enfermedad identificada como distrofia muscular de Duchenne, de Becker, de cinturas, congénita, facioescapulohumeral, miotónica, oculofaríngea, distal o de Emery-Dreifuss. En una forma de realización particular, la distrofia muscular es la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Por tanto, en una forma de realización, la composición farmacéuticamente aceptable de la presente invención es para uso en el tratamiento de la DMD.

15 [0070] En una forma de realización, el término tratamiento se refiere al alivio o mejora de uno o más síntomas asociados con distrofia muscular, retraso o ralentización de ese deterioro. Según algunas formas de realización, el tratamiento de la distrofia muscular comprende promover la formación de miotubos. El término "formación de miotubos", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que los mioblastos se fusionan en fibras multinucleadas, miotubos. Según algunas formas de realización, el término tratar la distrofia muscular comprende además reducir el tiempo hasta el inicio de la actividad contráctil espontánea de dichos miotubos. El tiempo hasta el inicio de la actividad contráctil espontánea se define como el tiempo necesario para que los mioblastos se fusionen y comiencen a contraerse espontáneamente.

20 [0071] De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, el ACC se estabiliza mediante al menos un agente estabilizador como se describe aquí anteriormente. De acuerdo con una forma de realización, el ACC estabilizado es ACC natural obtenido de una fuente natural, por ejemplo, de gastrolito, o sintetizado químicamente.

25 [0072] De acuerdo con una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende ACC estabilizado por al menos un agente estabilizante para usar en el tratamiento de DMD, donde el agente estabilizante se selecciona de fosfoerina, trifosfato, adenosina trifosfato, adenosina difosfato, ácido fítico, ácido cítrico, ácido etidróico, pirofosfato, etanol, hexametáfosfato, quitina y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con algunas formas de realización, el agente estabilizador se selecciona de fosfoerina, trifosfato, bisfosfonato y combinación de los mismos con ácido cítrico. De acuerdo con una forma de realización, la composición farmacéutica se administra sistémicamente, por ejemplo, por vía oral.

30 [0073] De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de ACC estabilizado por al menos un agente estabilizante, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada de un defecto axonal y distrofia muscular.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Efectos de ACC en cocultivos SC-DRG

Métodos

45 Medio de cultivo

[0074] El medio de cultivo estaba compuesto por: 90 % de mezcla de nutrientes F-12 (DMEMF12) medio empobrecido en calcio (medio sin iones de calcio) de Dulbecco modificado por Dulbecco (preparación especial), 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS), 6 g/ L D-glucosa, glutamina 2 mM, gentamicina 25 µg/mL y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-I) 0,05 ng/ml (todos adquiridos de Biological-Industries, Israel).

NVR-Gel como sustrato para el cultivo neuronal

55 [0075] El gel de reconstrucción neural y vascular (NVR-Gel, propiedad de NVR Labs) está compuesto por dos componentes principales: ácido hialurónico de alto peso molecular (HA, 33106 Da, BTG, Israel) y laminina (Sigma). Para el cultivo de células neuronales, se diluyó NVR-Gel al 1% con medio de cultivo hasta una concentración final de 0,3-0,5%. El gel tiene la textura de un líquido viscoso, se adhiere con facilidad y éxito a las células incrustadas o explantes al sustrato de plástico o vidrio, y permite el crecimiento de fibras nerviosas en un patrón 3D.

60 Preparación de cultivos de tejido neuronal

[0076] Todos los experimentos fueron realizados y autorizados por el comité de ética local reconocido por las autoridades israelíes para la experimentación con animales. Se prepararon cultivos organotípicos estacionarios de ganglios de la raíz dorsal (DRG) y médula espinal (SC), así como cultivos de células cerebrales disociadas a partir de fetos de rata (15 días de gestación, endogamia Lewis, Harlan, Israel). Inmediatamente después de la disección, los tejidos

aislados se cortaron con un cortador de tejidos Macwain en rodajas pequeñas (de 400 μm de espesor). En estos estudios, se utilizaron dos estrategias de cultivo de tejidos. En el primer método, los cortes de tejido se sembraron directamente en placas de cultivo de 12 pocillos que contenían 1 mL de medio de cultivo que contenía NVR-Gel al 0,3 %-0,5 %. En el segundo método, los cortes de tejido se disociaron aún más con una solución de tripsina-EDTA durante 30 minutos y se lavaron con un medio de cultivo. Posteriormente, las células disociadas se añadieron a una suspensión de polvo de quitosano o polvo de gastrolitos (microportadores, MCs) y se incubaron en suspensión a 37 °C durante 4 días. A continuación, los agregados de células flotantes/MC se recogieron y sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos que contenían 1 mL de medio de cultivo que contenía gel NVR al 0,3 %-0,5 %.

10 Fuente de suplemento Ca^{2+}

15 **[0077]** La fuente de Ca^{2+} (enumerada a continuación) a una concentración final de 1 o 2 mM se añadió una vez al gel en la etapa de siembra y luego al medio nutritivo en cada alimentación consecutiva. Las fuentes de calcio fueron las siguientes: ácido ACC-etidróico (ACC-ET) (suspensión fresca); ACC-Fosfoferina (ACC-PS) (suspensión fresca); Gastrolith (disuelto con HCl 0,1 M y luego neutralizado con NaOH 1 M); polvo de gastrolitos; CCC - Suspensión acuosa de carbonato de calcio cristalino (polvo comercial de nanopartículas); y solución de CaCl_2 - control.

20 **[0078]** Los cultivos se controlaron mediante observaciones microscópicas de contraste de fase diarias a partir de las 24 horas posteriores al establecimiento de los cultivos en adelante.

25 **[0079]** Las suspensiones de preparaciones frescas de ACC consistían en partículas que formaban una suspensión estable. El gastrolito es un ACC natural aislado de los cangrejos y solo se puede comprar en forma de polvo seco. De esta forma, sus otros componentes característicos (como los iones de calcio y las proteínas) no están disponibles para las células. Para aumentar su biodisponibilidad, el polvo de gastrolito se disolvió en HCl 0,1 M (que imita la acidez que existe en el estómago) y luego se neutralizó con NaOH 1 M.

30 Tinción inmunofluorescente de cultivos neuronales

35 **[0080]** Después de retirar el medio de cultivo, los cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRG) se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 min, y luego se lavaron nuevamente con PBS. Las células fijadas se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % en PBS y luego se inmunobloquearon (para evitar tinciones no específicas) con albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron con anticuerpos anti-neurofilamento de conejo (NF, Novus Biologicals, 1:500) para visualizar el crecimiento de neuritas. Los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA al 0,1 % y Tween-20 al 0,05 % en PBS (tampón diluyente) y se incubaron con las muestras durante la noche a 4 °C. Después de enjuagar con Tween-20 al 0,05 % en PBS (tampón de lavado), las muestras de GRD se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios IgG anti-conejo de burro conjugado con Alexa-Fluor-594 (Jackson ImmunoResearch, EE. UU., 1: 800 en un tampón diluyente). Finalmente, las muestras se enjuagaron nuevamente con tampón de lavado y se montaron con medio de montaje (Immco Diagnostic, EE. UU.). Todas las imágenes fueron observadas con un microscopio Olympus IX70.

40 **Resultados**

45 **[0081]** Se examinó el efecto de varias preparaciones de calcio en cocultivos SC-DRG. En general, los cultivos contenían cortes SC de 400 micrómetros con cortes de DRG unidos o separados. Se puede decir que todas las preparaciones de ACC examinadas (ACC-ET, ACC-PS y gastrolito) mejoraron significativamente la regeneración de fibras neuronales en comparación con CCC y CaCl_2 . **La Tabla 1** muestra la porción de explantes (de 6) que exhibieron brotación de fibras nerviosas después de 4 días de cultivo en presencia de las diversas preparaciones de calcio (concentración de Ca^{2+} de 2 mM) o en presencia de estabilizadores solos (el estabilizador se agregó a la concentración de 0,05% a cada pozo (a partir de una solución madre de 5%)). Se puede observar que la brotación más intensa se observó en los cultivos expuestos a ACC-ET (100% de los explantes), seguido de ACC-PS y Gastrolith (66,6% de los explantes). El CCC y CaCl_2 indujeron brotación neuronal solo en el 50% de los explantes, y los estabilizadores solos incluso en un porcentaje menor (0-33%). Durante el establecimiento de los cultivos (después de la primera semana de cultivo) las fibras nerviosas regeneradas se alargaron, más gruesos y ramificados, hasta la formación de redes neuronales, principalmente en cultivos expuestos a las diversas preparaciones de ACC (**Fig. 1**).

Tabla 1: El efecto de las preparaciones de ACC en el brote temprano de fibras nerviosas de cocultivos SC-DRG.

Tipo de preparación de calcio	Cultivos con regeneración axonal (%)
ACC-ET (suspensión fresca)	100
ACC-PS (suspensión fresca)	66,6
Gastrolito	66,6
CCC (carbonato de calcio cristalino)	50
Solución acuosa de CaCl ₂ (control)	50
ET	33,3
PD	0

Ejemplo 2. Efectos de ACC en cultivos de cerebro

[0082] El efecto de ACC se estudió en cultivos de agregados de células cerebrales-MC sembrados en gel después de 4 días en suspensión (ver parte de métodos del Ejemplo 1). Los resultados se presentan en la **Fig. 2** y muestran que el ACC mejoró la regeneración de las fibras nerviosas, significativamente más que el cloruro de calcio. Esto es especialmente notable cuando se compara el número y la longitud de las fibras nerviosas entre los dos tratamientos.

Ejemplo 3. Efectos de las preparaciones de ACC en células de músculo esquelético sanas

Métodos

Preparación de cultivos de músculo esquelético

[0083] Se prepararon cultivos de músculo esquelético estacionarios a partir de ratas recién nacidas sanas de 1 día (Sprague Dawley, Harlan, Israel). El tejido muscular se diseccionó de las patas posteriores y se picó a fondo. La digestión se realizó con tripsina-EDTA mientras se trituraba suavemente. Después de 30 minutos, se recogió el sobrenadante, que contenía células disociadas, y se añadió una nueva Tripsina-EDTA. Este procedimiento se repitió dos veces más. Luego, todos los sobrenadantes se agruparon, se centrifugaron y el sedimento celular se resuspendió en medio de proliferación. Las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos recubiertas con gelatina, 1×10^5 células/pocillo que contenían 1 ml de medio de proliferación. Dos días más tarde, el medio se cambió a Fusion Medium, que luego se cambió dos veces por semana. Los cultivos se controlaron mediante observaciones microscópicas de contraste de fase diarias a partir de las 24 horas posteriores al establecimiento de los cultivos y en adelante. En días predeterminados, los cultivos se fijaron en metanol durante 20 minutos y luego se tñieron con Giemsa para evaluar el número de mitotubos formados con el tiempo en los cultivos.

Placas de cultivo recubiertas con gelatina

[0084] La solución madre de gelatina porcina al 1% en agua se esterilizó en autoclave. Una vez enfriado, se añadieron 500 µl de la solución a cada pocillo de la placa de cultivo de 12 pocillos. Después de incubar durante 20 min a temperatura ambiente, se eliminó el exceso de solución y se sembraron las células.

Medio de proliferación

[0085] Para la etapa de proliferación, las células se cultivaron en: DMEM/F12 (que contiene Ca²⁺ 1 mM) + FBS al 10 %, gentamicina 25 µg/mL y L-glutamina 2 mM.

Medio de fusión

[0086] Para la etapa de fusión, el medio de proliferación se cambió por medio de fusión, que se preparó de la siguiente manera: DMEM/F12 (que contiene Ca²⁺ 1 mM), suero de caballo (HS) al 2 %, L-glutamina 2 mM, gentamicina 25 µg/mL y 4 unidades/100 mL de insulina (todas compradas en Biological-Industries, Israel).

Lista de preparaciones de calcio probadas

[0087] El medio de fusión se enriqueció con las diversas preparaciones de calcio enumeradas en la **Tabla 2**, a una concentración de Ca²⁺ de 1 mM (dado que el medio ya contenía 1 mM de iones de calcio, la concentración final de Ca²⁺ fue de 2 mM). Los cultivos de control se cultivaron sin calcio añadido adicional, o cultivos enriquecidos con estabilizador libre (soluble). El experimento fue cegado al marcar las diversas preparaciones de calcio solo con números arbitrarios.

[0088] Los componentes se añadieron de una de las siguientes maneras: (i) suspensiones acuosas de material seco; (ii) suspensión acuosa de material fresco (antes del secado), o (iii) disuelto con HCl (para imitar la acidez que existe en el estómago). Después de lograr la disolución, las soluciones formadas se neutralizaron con NaOH 1 M).

Tabla 2 - Lista de materiales probados

Sustancia añadida	Concentración total de calcio (mM) incluyendo iones Ca^{2+} 1mM del medio
ACC-Ácido etidróico (ACC-ET)	2
ACC-pirofosfato (ACC-PyP)	2
ACC-Fosfoserina (ACC-PS)	2
ACC-Trifosfato de adenosina (ACC-ATP)	2
ACC-Difosfato de adenosina (ACC-ADP)	2
ACC-Ácido fítico	2
ACC-Ácido cítrico	2
Carbonato de calcio cristalino (CCC) (polvo disponible comercialmente)	2
Solución acuosa de CaCl_2	2
ET	1
PyP	1
PD	1
ATP	1
ADP	1
Ácido fítico	1
Ácido cítrico	1
Control	1

Resultados

Efecto del ACC seco sobre el músculo esquelético sano

[0089] En la primera etapa se utilizó polvo seco de ACC. Los polvos (listados en la Tabla 2 según los estabilizadores utilizados en su preparación) se suspendieron en agua y luego se agregaron a los medios de cultivo en la concentración de 1 mM. Dado que el medio ya contenía 1 mM de iones de calcio, la concentración final de Ca^{2+} fue de 2 mM. Los resultados, algunos de los cuales se muestran en la **Fig. 3** (lado izquierdo), revelaron que los cultivos expuestos a ACC exhibieron una formación temprana de muchos miotubos dentro de los 4 días de cultivo, sin diferencias significativas entre las diferentes preparaciones de ACC. En los cultivos de control, que se expusieron a CCC o CaCl_2 añadidos, se observó más tarde la formación de miotubos. Después de 7 días, los cultivos que fueron tratados con ACC exhibieron numerosas fibras musculares largas y gruesas, mientras que en los cultivos tratados con CCC y CaCl_2 , se desarrollaron menos fibras musculares, más delgadas y más cortas (Fig. 3; lado derecho).

[0090] También se observa que en cultivos expuestos a preparaciones de ACC, las contracciones musculares ya se observaron el día 7 después de la siembra, mientras que en cultivos expuestos a CCC o CaCl_2 añadido, las contracciones musculares aparecieron solo después de 10 días o más.

[0091] Se concluyó a partir de los resultados *in vitro* anteriores que todas las preparaciones de ACC mejoran la formación de miotubos y la contractilidad muscular temprana de los cultivos de músculo estriado sano.

Ejemplo 4 - Evaluación del efecto de ACC en la línea de células musculares de distrofia muscular de Duchenne - estudios *in vitro*

Métodos

Preparación de células Mdx

[0092] Se investigó la influencia de las diferentes preparaciones de calcio en la línea celular mdx (modelo de distrofia muscular de Duchenne), que fue amablemente proporcionado por el Prof. (Emérito) David Yaffe del Instituto de Ciencias Weizmann, Israel.

[0093] Las células de la línea celular Mdx se sembraron en una placa de cultivo de 12 pocillos recubierta con gelatina, 33104 células/pocillo que contenía 1 mL de medio de proliferación. Dos días más tarde (~66 % de confluencia), el medio se cambió a Medio de Fusión, que se cambió dos veces por semana. Las diversas preparaciones de calcio se agregaron por separado al Medio de Fusión de acuerdo con el tratamiento descrito en la **Tabla 3**. Los cultivos se enriquecieron con las diversas preparaciones de calcio, a una concentración de Ca^{2+} de 1 mM. Al tener el medio ya 1 mM de iones de calcio, entonces la concentración final de Ca^{2+} fue de 2 mM.

Tabla 3: Fuentes de calcio

Tratamiento	Fuente de calcio (2mM)
Control	CaCl ₂
ACC-ET	Carbonato de calcio amorfo-ácido etidróico
ACC-PS	Carbonato de calcio amorfo-fosfoferina

[0094] Los efectos de las preparaciones de calcio ensayadas sobre la proliferación celular, la fusión para formar miotubos y la contracción muscular se controlaron mediante observación microscópica diaria de contraste de fase. En días predeterminados, los cultivos se fijaron en metanol durante 20 minutos y luego se tiñeron con Giemsa para evaluar el número de miotubos formados con el tiempo en los cultivos.

Análisis de creatina quinasa (CK) en cultivo de tejido muscular

[0095] En cultivos de células musculares, la CK es un indicador de la formación de miotubos y el nivel de CK aumenta (en placas de cultivo de tejidos) en correlación directa con la progresión de la formación de miotubos en cultivos musculares. En días predeterminados, las células se recogieron de los pozos de cultivo (usando un policía de goma) y se mantuvieron en 1 mL de PBS (sin Ca²⁺) a -70°C hasta su análisis. Para la medición de CK, las muestras de células se descongelaron y lisaron físicamente usando un sonicador, para liberar la CK de los miotubos musculares. La concentración de CK se determinó utilizando el kit de ensayo de actividad de creatina quinasa (CK-NAC REAGENT SET, CURTISS, CHEM-INDEX INC, Hialeah, FL, EE. UU.).

Resultados

[0096] Los resultados de los experimentos anteriores se presentan en las **Figs. 4 y 5**. Como puede verse claramente, la adición de ACC mejoró la fusión celular y la formación de miotubos mejor que la adición de una fuente de iones de calcio convencional (CaCl₂). Este sorprendente resultado se demostró tanto en análisis bioquímicos (actividad de CK) como morfológicos (microscopía) (**Fig. 4 y 5**). Además, en los cultivos expuestos a las preparaciones de ACC, las contracciones musculares ya se observaron el día 7 después de la siembra, mientras que en los controles aparecieron solo después de 10 días o más. Por lo tanto, se concluye que la suplementación con ACC tiene potencial para tratar a los pacientes con DMD.

Ejemplo 5 - El efecto de las fuentes de calcio en células primarias de ratón *mdx*

Método

Extracción de células primarias

[0097] Los músculos del muslo se extrajeron de las patas posteriores de ratones *mdx* recién nacidos (un día de edad) en condiciones estériles y se lavaron en PBS para eliminar el exceso de células sanguíneas. Los músculos fueron picados en pequeños fragmentos. Para la disociación enzimática, los fragmentos de músculo se colocaron en una solución bicker que contenía tripsina-EDTA (0,25 mM). Para asegurar la separación celular, la mezcla se colocó en un agitador, a temperatura ambiente, con agitación suave durante 20 min. La sopa se recogió y se centrifugó a 300 x g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en DMEM que contenía FBS. Los pasos de tripsinización se repitieron durante 3 ciclos más. Todos los sobrenadantes se combinaron en un tubo. La separación celular se determinó visualmente (usando microscopía de contraste de fase). La densidad de células se determinó utilizando un hemocitómetro.

[0098] Las células se sembraron en una placa de 12 pocillos a una concentración de 2x10⁵ células/pocillo. El medio utilizado fue DMEM/F12 W/O Ca²⁺ con la adición de FBS al 15 % y L-Glutamina Gentamicina 2 mM (25 µg/ml). Se añadió calcio por separado al medio según el tratamiento descrito en la **Tabla 4**. En el día 2 (~66 % de confluencia) se cambió el medio a medio de fusión (DMEM/F12 sin Ca²⁺ con la adición de HS al 10 %, insulina (4 unidades/100ml) y Gentamicina (25 µg/ml)). El medio se cambió cada 3 días.

Tabla 4. Fuentes de calcio utilizadas en el estudio de células primarias

Tratamiento	Fuente de calcio (2mM)
Control	CaCl ₂
ACC-PP	Carbonato de calcio amorfo estabilizado por polifosfato
ACC-PS	Carbonato de calcio amorfo estabilizado por fosfoferina

[0099] La proliferación celular y la fusión se controlaron cualitativamente diariamente. Los cultivos se fijaron los días 2, 3, 4, 5 y 7 y se tiñeron con Giemsa o usando el anticuerpo de miosina.

Resultados

[0100] Los resultados se presentan en las Fig. 6 y 7. El efecto beneficioso de las formulaciones de ACC se demostró mediante la formación de miotubos, específicamente en puntos de tiempo tempranos, los días 3 y 4 en comparación con el control. Las diferencias en los miotubos formados se volvieron indistinguibles en los días 5 y 7. Hubo una alta correlación entre la tinción de Giemsa y la tinción de miosina.

Ejemplo 6 - Evaluación del efecto de ACC sobre la distrofia muscular en ratones - estudios *in vivo*

[0101] A los ratones experimentales se les administró por vía oral (alimentándolos o bebiéndolos) con elementos de control o de prueba. Los elementos de control o de prueba se administraron repetidamente diariamente hasta la terminación del estudio (después de 12 semanas).

Tabla 5. Diseño del estudio

Grupo n.º	Cepa	n=	Detalles del tratamiento
1M	C57BL	n=3	Dieta comercial para roedores (Teklad)
2M	mdx	n=12	Dieta comercial para roedores (Teklad)
3M		n=12	Dieta baja en calcio (TDK95027, Harlan Inc) que contiene 1 % de calcio elemental de CCC sintético <i>ad libitum</i>
4M		n=12	Dieta baja en calcio (TDK95027, Harlan Inc) que contiene 1 % de calcio elemental de ACC sintético (5 % PS) <i>ad libitum</i>
5M		n=12	Agua con 0,06% de Calcio elemental de ACC sintético (10% PP) <i>ad libitum</i>
PS- estabilizado con fosfoferina PP- estabilizado con polifosfato			

[0102] Sistema de prueba:

Especie: Ratones
 Cepa Mdx: C57Bl/6J ScSn/DMD mdx/J
 Cepa de tipo salvaje: C57BL/6J OlaHsd.
 Género y edad: Machos, 3 semanas de edad al inicio del estudio
 Peso corporal: la variación de peso de los animales al inicio del estudio no debe exceder el $\pm 5\%$ del peso medio del género.
 Carcasa: antes del inicio del estudio, los animales se alojaron en jaulas de polietileno que medían 42,5 x 26,5 x 18,5 cm, con una rejilla superior de acero inoxidable que facilitaba el alimento granulado y el agua potable en botellas de plástico y llenas de virutas de madera (ropa de cama Harlan Teklad Aspen/ Sani-chips) como material de lecho. El material de lecho se cambió junto con la jaula al menos una vez por semana.
 Identificación: crotal y tarjetas de jaula.
 Terminación: Al final del estudio, los animales fueron sacrificados por asfixia con CO₂.
 Justificación: Los ratones MDX son un modelo animal común para evaluar la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

Definición de inicio de estudios

[0103] La primera administración de elementos de prueba o control se definió como "Día 1".

Definición del final del estudio

[0104] El estudio se terminó 12 semanas después del comienzo.

Punto final humanitario

[0105] Los animales que se encontraron en un estado moribundo y los animales que mostraban dolor intenso o signos duraderos de angustia grave fueron sacrificados humanamente. Se informaron animales que mostraron una disminución del peso corporal superior al 20% del peso corporal inicial.

Administraciones de elementos de prueba

[0106] A los animales se les administró ACC con la comida o con la bebida. A los animales se les administró CCC con alimentos. El control se administró mediante alimentación. Los ítems de control o de prueba se administraron repetidamente diariamente hasta la terminación del estudio.

Pruebas y evaluaciones

Observación de Morbilidad y Mortalidad

5 **[0107]** Las observaciones de signos de morbilidad y mortalidad se realizaron diariamente al finalizar el estudio.

Medidas de peso corporal

[0108] Las mediciones del peso corporal se registraron una vez por semana y al final del estudio, 12 semanas.

10 **Recolección de sangre y preparación de suero para los niveles de creatinina quinasa (CK):**

[0109] Al finalizar el estudio, se extrajo una muestra de sangre de todos los animales bajo anestesia ligera con Ketmaine/Xylazine, directamente del seno retroorbital.

15 **[0110]** Se recogieron 200 µl de sangre en un tubo de copa amarilla con gel activador de la coagulación. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para la coagulación y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 4000 RPM. Las muestras de suero se almacenan a 2-4 °C hasta que se envían al análisis de CK en los laboratorios de AML.

20 **Quinasa de creatinina - resultados**

25 **[0111]** El resultado de la prueba de creatinina quinasa se muestra en la **Fig. 8** y demuestra una tendencia clara. Todos los ratones mdx mostraron valores elevados de CK frente al tipo salvaje, lo que indica destrucción muscular. Sin embargo, la elevación fue significativamente más moderada en el grupo que recibió ACC con alimentos (grupo 4M) en comparación con el grupo que recibió solo una dieta normal (grupo 2M; prueba t de Student, valor de P = 0,034). Mientras que los ratones del grupo 3M que recibieron CCC también mostraron una elevación más moderada en los niveles de CK en comparación con los ratones del grupo 2M (sin tratamiento), la diferencia no fue estadísticamente significativa (prueba t de Student, valor de P = 0,45).

30 **[0112]** El grupo 5M que recibió ACC por bebida demostró resultados similares a los del grupo 3M que recibió CCC por comida (21,164±8,391 y 21,676±14,508 UI/ml, respectivamente). Sin desear limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción, se sugiere que la razón de la diferencia en los resultados entre los grupos 4M (ACC en la comida) y 5M (ACC en la bebida) puede deberse a la heterogeneidad de la suspensión de ACC y por lo tanto, administración no uniforme de la ACC. Sin embargo, está claro que la administración de ACC alivió significativamente los síntomas de DMD en los ratones mdx.

Ejemplo 7 - Evaluación del efecto del consumo de ACC sobre la distrofia muscular en ratones MDX.

40 **[0113]** En el presente ejemplo, el efecto de ACC estabilizado por diferentes estabilizadores en ratones mdx (modelo de roedor de distrofia muscular de Duchenne).

Artículos de prueba

45 **[0114]** A los ratones se les administró ACC estabilizado por vía oral (alimentación) todos los días o mediante inyecciones IP, consecutivas, seis veces a la semana. Los ítems de control o prueba se administraron de manera similar.

Sistema de prueba:

[0115]

50 Especies: Ratones

Cepa Mdx: C57Bl 10ScSn/DMD mdx/J

Cepa de tipo salvaje: C57Bl/6J01aHsd.

Género y edad: Machos, 3-5 semanas de edad al inicio del estudio

55 Peso corporal: La variación de peso de los animales al inicio del estudio no debe exceder el ± 15 % del peso medio del género.

Tamaño del grupo: véase la Tabla 1, diseño del estudio

N.º de grupos: 6 (véase la **Tabla 6**)

Tabla 6. Diseño del estudio

Grupo n.º	Cepa	n =	Nombre del grupo y detalles del tratamiento	Ruta de administración	Duración
1M	C57BL-Roedor	6	Control de tipo salvaje - dieta comercial (Teklad)	Alimentación	24 semanas
2M	MDX-Roedor	8	Mdx control - dieta comercial		
4M		10	ACC estabilizado por PS-Low Calcium Diet (TDK95027, Harlan Inc.) que contiene 1 % de calcio elemental de ACC sintético (5 % PS) <i>ad libitum</i>		
3M		10	ACC estabilizado por TP-Low Calcium Diet (TDK95027, Harlan Inc.) que contiene 1 % de calcio elemental de ACC sintético (6 % TP-2 % de ácido cítrico) <i>ad libitum</i>		
5M	MDX-Roedor	10	ACC estabilizado por TP- 200µl que contienen 0,1% de calcio elemental de ACC sintético (10% TP) Las inyecciones se realizan 6 veces consecutivas a la semana	Inyección intraperitoneal (IP)	12 semanas
6M		6	Control - control salino - 200 µl Las inyecciones se realizan 6 veces consecutivas a la semana ml que contiene solución salina. Vehículo		
PS-fosfoserina; TP-trifosfato					

Procedimiento experimental:

[0116] El ratón MDX es un modelo animal para evaluar la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

[0117] Definición de fin del estudio: El estudio finaliza a las 24 semanas desde el comienzo para los grupos 1-4 y 12 semanas desde el comienzo para los grupos 5-6.

Administraciones de elementos de prueba

[0118] A todos los animales (excepto el control) se les administró ACC estabilizado con alimentos (todos los días) o mediante inyecciones IP (seis veces consecutivas a la semana).

Pruebas y Evaluaciones

Observación de Signos Clínicos

[0119] Los animales se observaron en busca de signos clínicos una vez por semana hasta la terminación del estudio.

[0120] Se realizaron observaciones de cualquier cambio en la piel, pelaje, ojos, membranas mucosas, vías respiratorias, aparición de secreciones y excreciones (p. ej., diarrea). También se incluyeron los cambios en la marcha, la postura y la respuesta al manejo, como la presencia de comportamiento extraño, temblores, convulsiones, sueño y coma.

[0121] Se registraron todas las anomalías observadas, los signos tóxicos, el estado moribundo y las muertes preterminales.

[0122] Los animales que fueron sacrificados humanitariamente durante la prueba se consideran para la interpretación de los resultados de la prueba como animales que murieron durante la prueba.

Medidas de peso corporal

[0123] Las mediciones del peso corporal se registraron una vez por semana, poco antes de la prueba de suspensión de las cuatro extremidades. Al comienzo y al final del estudio, también se midió el peso corporal.

Prueba funcional - Pruebas de suspensión de cuatro extremidades (prueba de agarre)

[0124] Se usó la prueba de suspensión de cuatro extremidades para monitorear la fuerza muscular y para indicar el deterioro neuromuscular y la coordinación motora. La prueba se utilizó para determinar la eficacia de ACC.

[0125] En la prueba de suspensión de cuatro extremidades, se utiliza un sistema de rejilla de alambre para medir la capacidad de los ratones para exhibir una tensión sostenida de las extremidades opuesta a su fuerza gravitatoria. El

tiempo de suspensión se mide en segundos, así como el impulso de retención mínimo (impulso de retención = masa corporal x tiempo de suspensión, [N seg], factor de conversión - 9.806×10^3 Newton/gr).

[0126] La prueba de agarre (prueba de suspensión de cuatro extremidades) se realizó de acuerdo con el protocolo TREAT-NMD SOP# DMD_M.2.1.005. Brevemente:

Se colocó un ratón (edad mínima - 4 semanas) en la parte superior de una rejilla (tamaño cuadrado de rejilla de aproximadamente $1 \times 1 \text{ cm}^2$) y se le permitió adaptarse a este entorno durante 3-5 segundos.

[0127] La cuadrícula se volteó de tal manera que el ratón está boca abajo. La altura de la rejilla se colocó al menos 35 cm por encima del suelo de la jaula. Se colocó una cantidad suficiente de ropa de cama blanda (5-7 cm) debajo de la rejilla para garantizar un aterrizaje suave. Los ratones a la edad de 4 a 24 semanas, naturalmente, intentan permanecer en la cuadrícula y evitar caer al suelo. Esta altura es lo suficientemente baja para no lesionar al animal y lo suficientemente alta para garantizar que se evite una caída.

[0128] Cada período de suspensión debe comenzar con las 4 patas del ratón agarrando la rejilla. El tiempo de colgado se midió con un cronómetro y se registró.

[0129] La prueba se realizó hasta un máximo de 600 segundos o se repitió 3 veces con un intervalo de descanso de al menos 2 minutos.

[0130] El tiempo de espera más largo se utilizó para evaluar el impulso de espera.

[0131] Se realizó la prueba de suspensión de cuatro extremidades cada semana durante todo el experimento.

Recolección de sangre y preparación de suero para los niveles de creatinina quinasa (CK):

[0132] Al finalizar el estudio, se extraen muestras de sangre de todos los animales bajo anestesia ligera (con Ketmaine/Xylazine) directamente del seno retroorbital.

[0133] Se recogen 200 μl de sangre en un tubo de copa amarilla con gel activador de la coagulación. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para la coagulación y se centrifugan a temperatura ambiente durante 10 minutos a 4000 RPM. Las muestras de suero se almacenarán a $2-40 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se envíen al análisis de CK en los laboratorios de AML.

Terminación del estudio y necropsia

[0134] Después del sangrado terminal, los animales se sacrifican por asfixia con dióxido de carbono y se realiza una patología macroscópica que examina los principales tejidos y sistemas de órganos.

Colección de músculos esqueléticos

[0135] Durante la necropsia, se recolectan músculos seleccionados (diafragma, cardíaco y gastrocnemio) de todos los animales. Los músculos de todos los animales se conservan en formalina tamponada neutra al 10 % (aproximadamente una solución de formaldehído al 4 %) durante al menos 24 horas para una futura histopatología.

Resultados

[0136] Los ratones de todos los grupos aumentaron de peso. No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal promedio en ninguno de los grupos.

Prueba funcional - Prueba de suspensión de cuatro extremidades - resultados intermedios

[0137] Se encontró una diferencia significativa en los impulsos de retención (HI) de ambos grupos mdx que se administraron por vía oral con formulaciones de ACC (estabilizador 1 - fosfoserina, estabilizador 2 - trifosfato) versus el grupo de control que se administró con dieta estándar (que contiene calcio), ver **Fig. 9**. La diferencia ya se observó en la segunda semana del estudio donde el HI de los ratones tratados con ACC fue 2 veces mayor que el HI del grupo de control. Estas diferencias aumentan a medida que avanza el estudio y alcanzan una meseta después de aproximadamente 6 a 8 semanas. Puede verse en la **Fig. 9** que el HI de los ratones tratados con ACC era aproximadamente X2 - X3,8 veces mayor que el del grupo de control.

Ejemplo 22. Crecimiento de células madre MBA13 (Bone Marrow Stromal Cells) a osteoblastos Material y métodos

[0138] Dos días después de la descongelación, las células MBA-13 (recibidas del Prof. Dov Zipori, Instituto de Ciencias Weizmann) se volvieron a suspender en solución de tripsina recombinante y se sembraron en una placa de 96 pocillos

(Día "0") en una concentración de 1×10^4 células. / pocillo utilizando medio basal MSC NutriStem® XF (Biological Industries, n.º de catálogo 05-200-1A) complementado con medio de mezcla de suplemento de células madre mesenquimales (MSC) (Biological Industries n.º de catálogo 05-201-06) en una proporción de 50 ml:300 µl. Las filas AH de las columnas 1-4 de la placa de 96 se recubrieron previamente con solución de unión MCS diluida en PBS (sin Ca^{2+} , Mg^{2+}), en una proporción de 1:100 para la siembra de células. Las filas AH de las columnas 5-8 de la placa de 96 se recubrieron previamente con gelatina al 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente.

[0139] El día 2, cuando se logró más del 80 % de confluencia celular (~48 h), el medio se cambió a medio osteogénico rápido MSCgo (n.º de cat. 05-442-1B) que contenía factores que promueven la diferenciación osteoblástica. Después del cambio de medio, las filas AC se complementaron con calcio 1 mM adicional (calcio total 2,488 mM) procedente de carbonato de calcio amorfo (ACC) estabilizado con trifosfato al 10 % + ácido cítrico al 1 %; las filas DF se complementaron con calcio 1 mM adicional (calcio total 2,488 mM) procedente de cloruro de calcio; La fila G de la placa se trató con medio MSCgo (calcio total 1,488 mM). La fila H de la placa se trató con la mezcla de suplemento + medio basal de nutrientes MSC NutriStem® XF (calcio total 1,488 mM).

[0140] El día 4, se intercambió el medio con preparaciones frescas de ACC.

[0141] Paralelamente, también se sembró una placa de control con líneas celulares MDX originadas a partir de músculos dañados de ratones MDX. La tinción de estas células se usó para establecer la tinción de fondo del calcio intrínseco de las células y también para eliminar la posibilidad de que se tiñe la deposición de calcio del tratamiento ACC. Antes de la siembra, los pocillos se recubrieron con gelatina, que se utiliza como sustrato estándar para la unión de células MDX. Se sembraron células MDX en una placa de 24 pocillos en una concentración de 3×10^4 células/pocillo. El día de siembra se define como "Día 0".

[0142] El día 2, el medio de los pocillos se reemplazó con lo siguiente:

[0143] Las columnas 1 y 2 se trataron con medio Spinal Cord (SC) que se prepara internamente (el medio comprende 0,6 % en peso de D-glucosa, 2 mM de L-glutamina, gentamicina 25 mg/ml, B27, N_2 , BSA 0,1 mg/ml, Hepes, FBS al 10 %, DMEM/F12 e IGF-I, 50 ng/ml) + 1 mM calcio procedente de ACC (concentración de calcio total de 2 mM); las columnas 3 y 4 se trataron con medio SC + 1 mM procedente de CaCl_2 ; Las columnas 5 y 6 se trataron con medio SC. Ambos tipos de células (MBA13 y MDX) se cultivaron hasta 10 días.

[0144] La fijación (con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos) de algunos pocillos de cada tipo se realizó los días 5, 7 y 10 después del intercambio de medio, es decir, los días 7, 9 y 12 del estudio.

[0145] Una vez fijadas las células, se utilizaron dos tipos de reactivos de tinción para teñir el calcio extracelular o el depósito óseo con el fin de estimar la funcionalidad de los osteoblastos: (i) Rojo de alizarina (Sigma A55333) y (ii) Fosfatasa alcalina (DAKO BCIP/NBT sustrato system K0598) como sigue:

Procedimiento de tinción con rojo de alizarina - el pH se ajustó a 4,2. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con metanol frío durante 5 minutos y luego se lavaron nuevamente con PBS. Se utilizó una solución de alizarina en una concentración del 2% durante 15-20 minutos. Después de la incubación de la tinción, las muestras se lavaron con agua 2-3 veces para eliminar la tinción inespecífica.

Tinción con fosfatasa alcalina - las células se lavaron 1 o 2 veces con PBS y luego se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 min. Luego, se lavaron 3 veces con PBS y luego de eliminar los restos de PBS, se usaron 3 gotas de la solución del kit BCIP/NBT para cubrir las células, incluido un pocillo vacío sin células como control para cuantificar el ensayo. La incubación del kit de fosfatasa alcalina se realizó durante 1 hora y luego se enjuagó con agua destilada.

50 Resultados

[0146] Se proporcionan los resultados de las células que se cultivaron durante 10 días y se tiñeron tanto con alizarina como con fosfatasa alcalina. La observación realizada antes de los 10 días apenas detectó ningún depósito de calcio en ambos métodos de tinción.

[0147] El estado de las células se observó con un microscopio óptico (sin fijación) en dos momentos, los días 2 y 4. En ambas observaciones, las células que se sembraron en pocillos recubiertos previamente con solución de fijación de MSC no estaban en buenas condiciones; las células se redondearon. Por el contrario, las células que se sembraron en pocillos previamente recubiertos con gelatina estaban en buenas condiciones. No obstante, se decidió continuar con ambos tipos de pre-revestimiento. Los siguientes resultados y procedimientos de tinción se refieren a células cultivadas en gelatina que se usó como sustrato de unión.

[0148] En la tinción con rojo de alizarina, los depósitos de calcio se detectan por un color rojo anaranjado.

5 [0149] La tinción con rojo de alizarina demostró una señal muy fuerte en las muestras de células de osteoblastos que se complementaron con ACC en comparación con las que se complementaron con CaCl_2 , que demostraron una señal débil únicamente (**Fig. 13**). Además de la señal, se puede observar en la figura que se tiñen grandes placas de depósito de calcio que no se observan en ninguno de los tratamientos controles.

10 [0150] La tinción con rojo de alizarina de las células cultivadas en medio rápido MSCgo también demostró cierta tinción de la deposición de calcio, pero el tamaño de la deposición y su cantidad son significativamente menores y se asemejan a la morfología y la cantidad observadas para las células complementadas con CaCl_2 . No se observó depósito de calcio en las células cultivadas en suplementos MSC NutriStem® XF (MSC sup; datos no mostrados). El medio MSC NutriStem® XF sup se usa normalmente para inducir la proliferación celular en lugar de la diferenciación. De hecho, el número de células observado es grande pero no se observa depósito de calcio.

15 [0151] Esta observación sugiere que el tratamiento con ACC mejora la diferenciación de células MBA13 en osteoblastos y aumenta la deposición de calcio de las células, es decir, mejora su funcionalidad.

20 [0152] Otro marcador independiente para la diferenciación de osteoblastos es la fosfatasa alcalina. Esta enzima se expresa al máximo cuando se produce la fase de maduración de la matriz de las células. La tinción con fosfatasa alcalina se utilizó como método complementario para detectar la diferenciación y funcionalidad de los osteoblastos a fin de verificar el resultado obtenido por la tinción con Alizarina.

25 [0153] La tinción con fosfatasa alcalina se muestra en color negro y los resultados se presentan en la **Fig. 14**. Las células MBA13 que se trataron con ACC demostraron una señal intensa en comparación con los otros tratamientos. De hecho, la tinción con fosfatasa alcalina respalda que la diferenciación de osteoblastos es mejor en cultivos tratados con ACC.

30 [0154] La tinción con alizarina de células MDX tratadas con medio enriquecido con ACC 10 días después de la siembra no demostró diferencias importantes en la tinción entre los tratamientos (ver **Fig. 15 AC**). Estos resultados respaldan que la tinción con rojo de alizarina de los osteoblastos se debe a la deposición de calcio por parte del osteoblasto y no a la deposición de ACC provocada por el tratamiento en sí (es decir, no es un artefacto experimental).

35 [0155] La tinción de fosfatasa alcalina de líneas celulares MDX (**Fig. 15 D-F**) demostró que no se produjo formación de hueso. Curiosamente, en la tinción con fosfatasa alcalina se observó una formación mejorada de miotubos en las células tratadas con ACC en comparación con las células cultivadas en medio suplementado con CaCl_2 o control.

35 Conclusiones

40 [0156] Tanto la tinción independiente, rojo de alizarina como la fosfatasa alcalina después de los 10 días de siembra en diferentes medios mostraron una tinción sustancialmente más fuerte de la deposición de células de osteoblastos que crecieron en medio suplementado con ACC en comparación con los controles utilizados.

45 [0157] Aunque se observaron grandes placas de deposición de calcio cuando las células se cultivaron en presencia de ACC, dicha deposición no se observó para las células que se cultivaron en un medio suplementado con CaCl_2 . Una señal más fuerte podría indicar una mayor funcionalidad, ya que la tinción demostró una mayor deposición de placa. El resultado obtenido por la tinción de células MDX sugiere que las placas no se originan a partir de la adición de ACC sino que son un resultado directo de la funcionalidad de los osteoblastos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende carbonato de calcio amorfo (ACC) estabilizado por al menos un agente estabilizador, para usar en el tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada de una distrofia muscular y un defecto axonal.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha distrofia muscular se selecciona de Duchenne, Becker, de cinturas, congénita, facioescapulohumeral, miotónica, oculofaríngea, distal, y distrofia muscular de Emery-Dreifuss, preferiblemente en donde dicha distrofia muscular es Duchenne distrofia muscular (DMD).
- 15 3. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, en la que el defecto axonal es un daño axonal, preferiblemente en la que el tratamiento del daño axonal comprende potenciar la regeneración de un nervio dañado.
- 20 4. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, donde el defecto o daño es a los nervios del sistema nervioso central o a los nervios del sistema nervioso periférico.
- 25 5. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho al menos un agente estabilizante se selecciona de un polifosfato, aminoácidos fosforilados, ácidos orgánicos, fosforilados, fosfonados, sulfatados o compuestos orgánicos sulfonados, ésteres fosfóricos o sulfúricos de ácidos hidroxicarboxílicos, bisfosfonatos, sacáridos y derivados de los mismos, proteínas, péptidos, proteínas fosforiladas, péptidos fosforilados, biopolímeros naturales y sintéticos y derivados de los mismos, y cualquier combinación de los mismos; preferiblemente en donde el agente estabilizador se selecciona de fosfoserina, trifosfato, adenosina trifosfato, adenosina difosfato, ácido fítico, ácido cítrico, ácido etidróico, pirofosfato, etanol, hexametáfosfato, quitina y cualquier combinación de los mismos.
- 30 6. La composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición se administra mediante una administración sistémica,
preferiblemente en la que dicha composición se administra por vía oral;
más preferiblemente donde la composición farmacéutica se formula en una forma de dosificación sólida seleccionada de tabletas, cápsulas, píldoras, polvo o gránulos; o en una forma de dosificación líquida o semilíquida seleccionada de un elixir, tintura, suspensión, jarabe, emulsión, coloide o gel.
- 35 7. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en donde la enfermedad o condición es un defecto axonal y la composición farmacéutica se administra localmente;
preferiblemente en el que la ACC se administra en la proximidad del nervio defectuoso o lesionado;
más preferiblemente donde la administración es por inyección, infusión o a través de una bomba;
incluso más preferido en el que la composición farmacéutica se formula como una forma de dosificación líquida o semilíquida seleccionada de suspensión, emulsión, coloide o gel.
- 40 8. La composición farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el diámetro promedio de las partículas primarias ACC estabilizadas es de alrededor de 10 nm a alrededor de 500 nm

FIG. 1

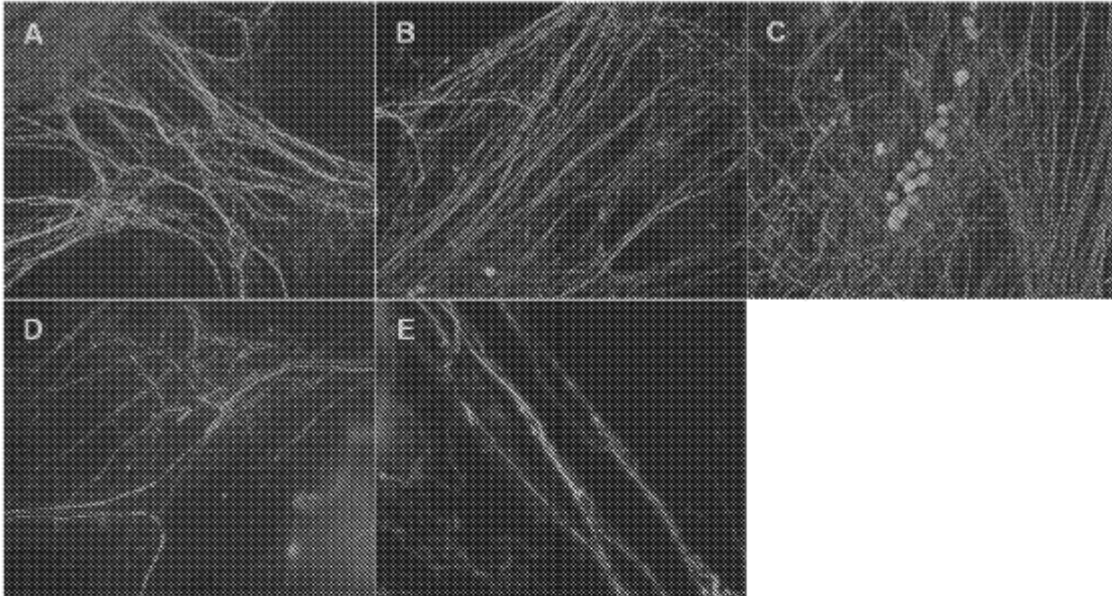


FIG. 2

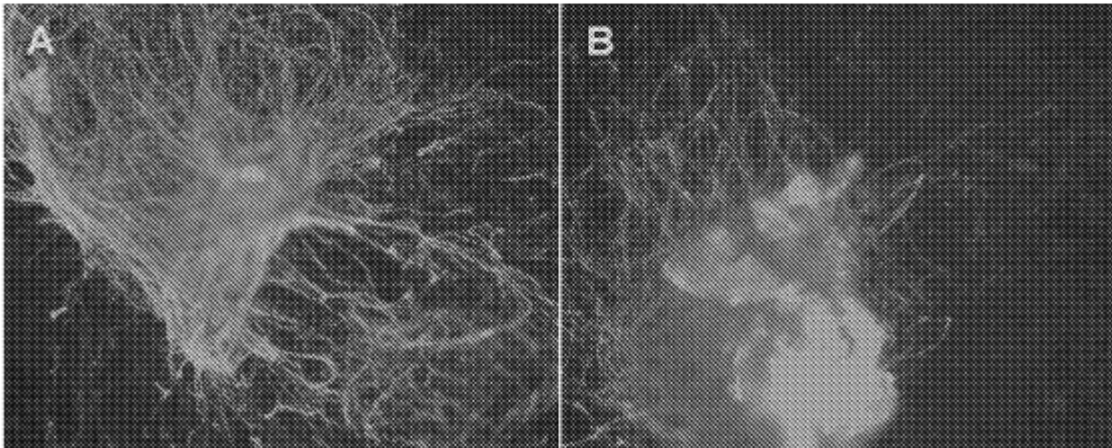
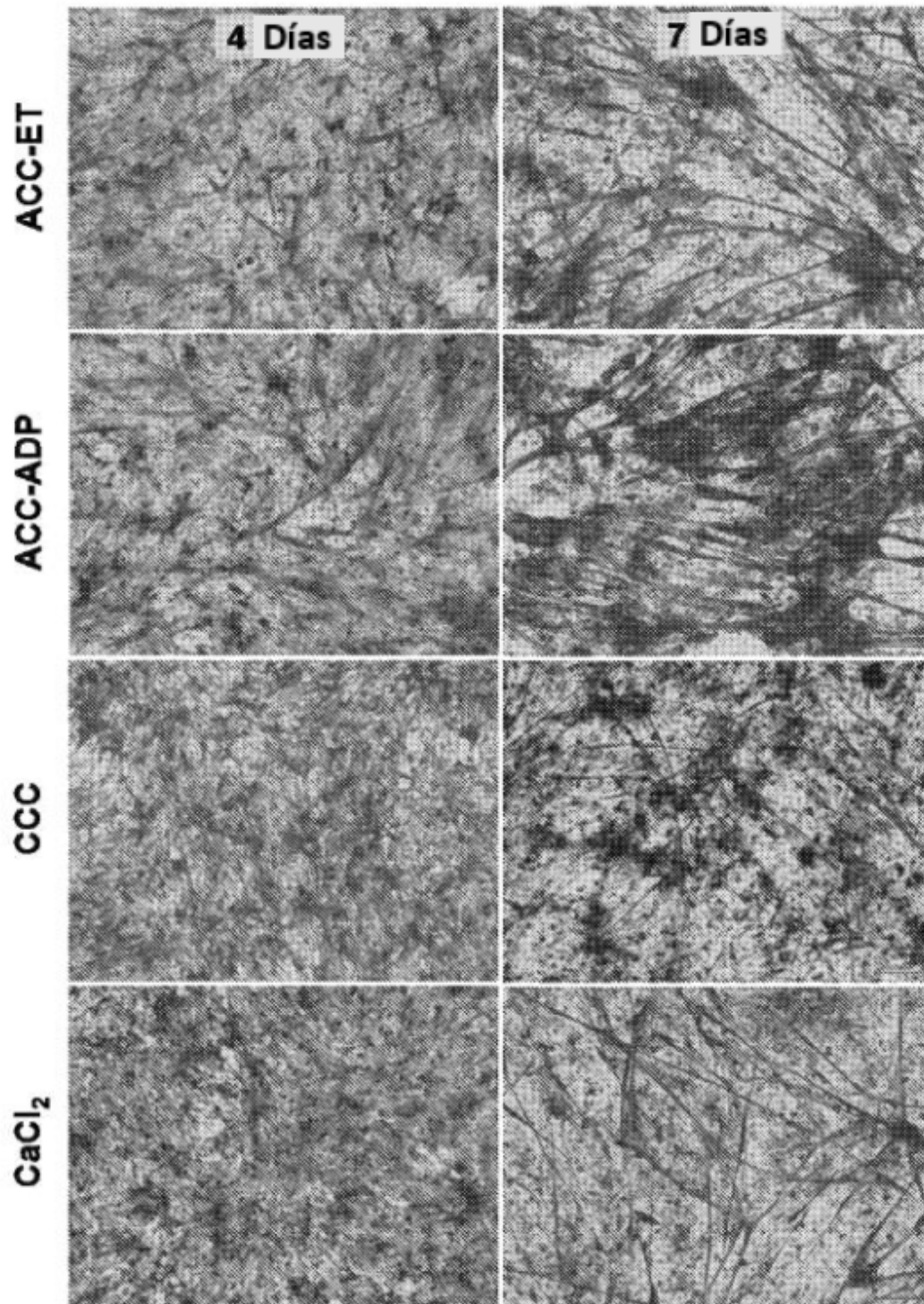


FIG. 3



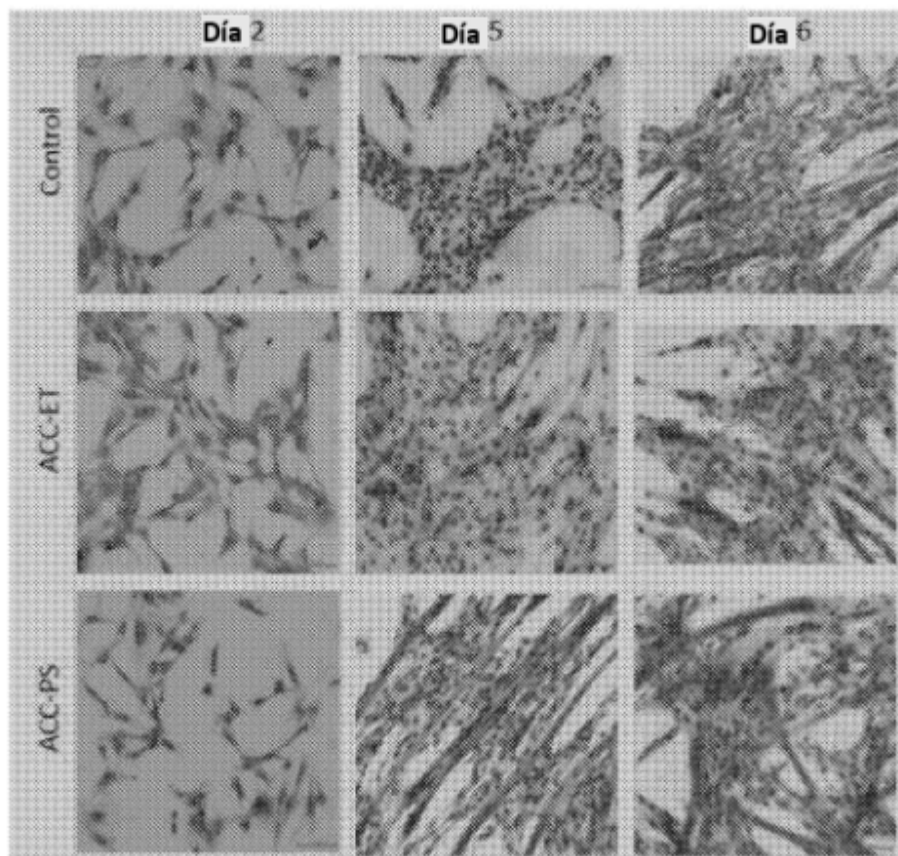


FIG. 4

Efecto de ACC en formación de miotubo en la línea celular MDX

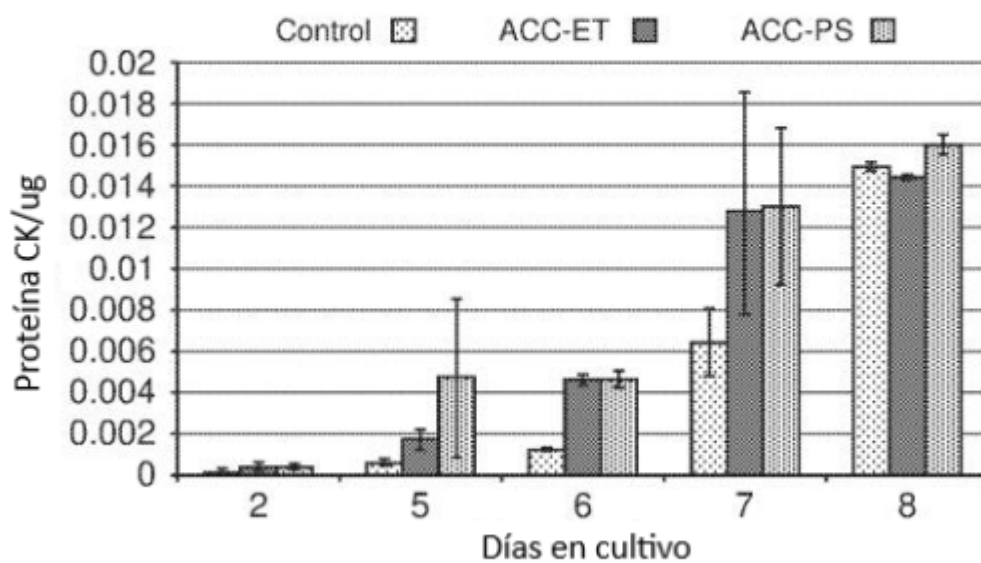


FIG. 5

FIG. 6

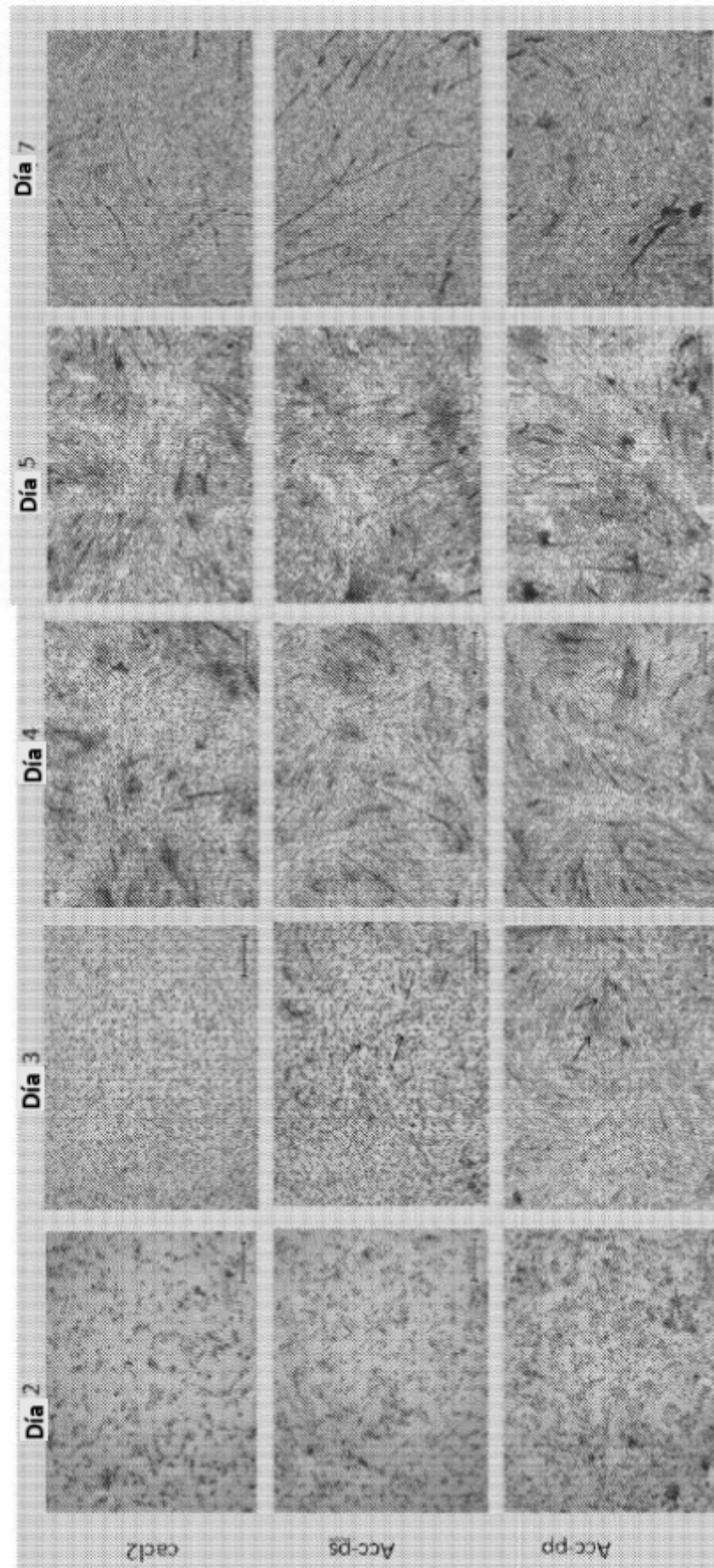
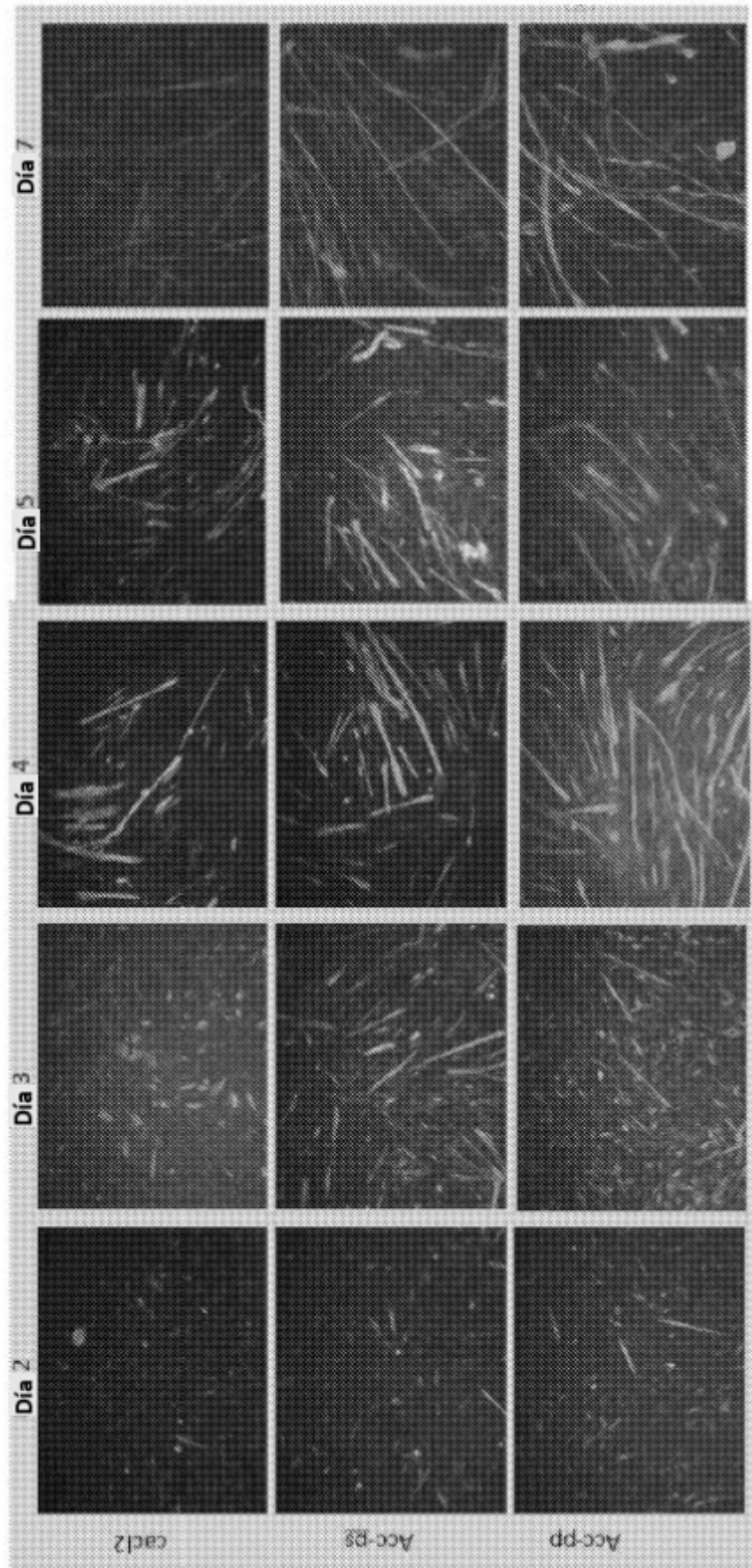


FIG. 7



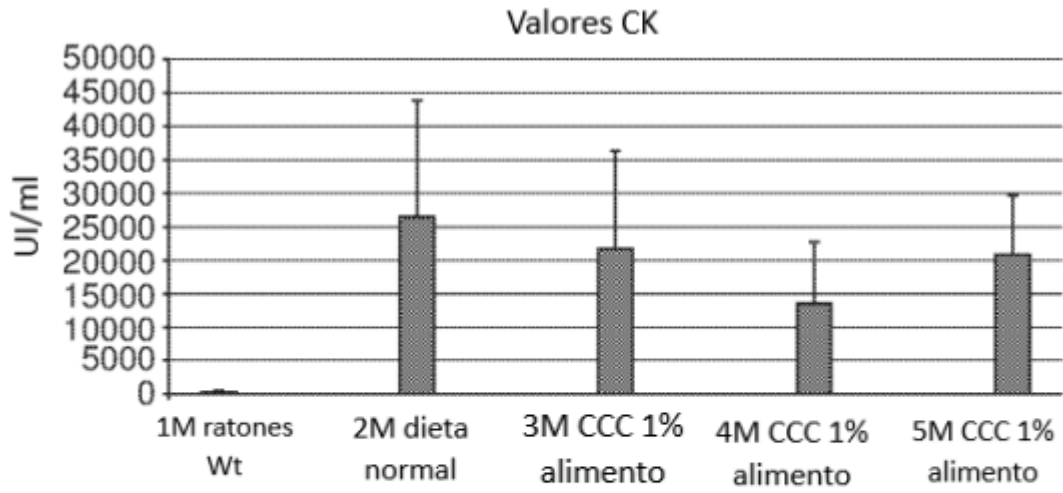


FIG. 8

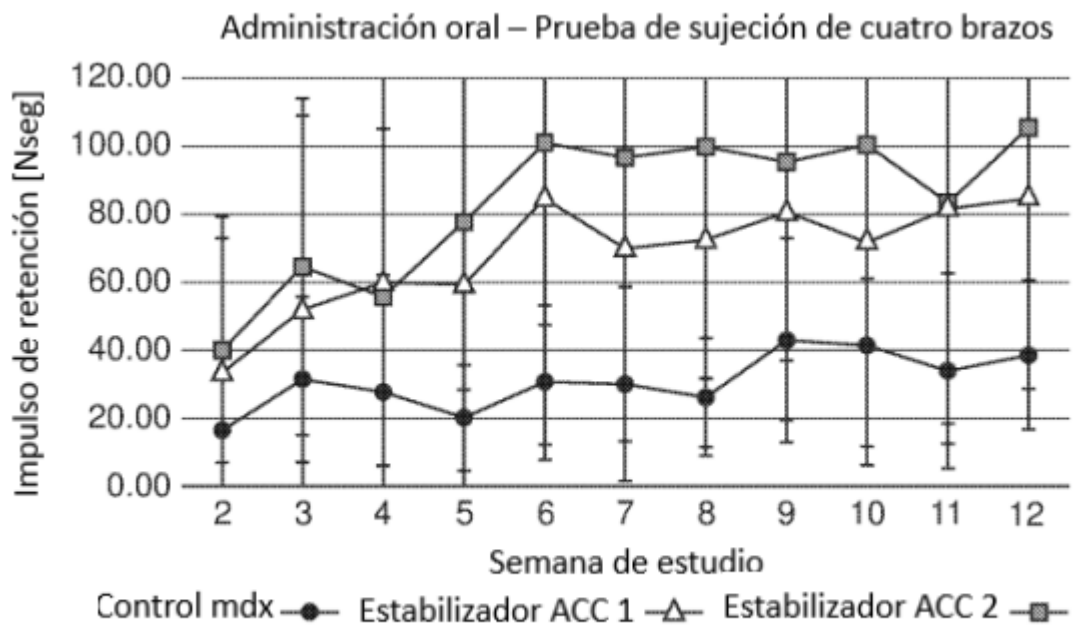


FIG. 9

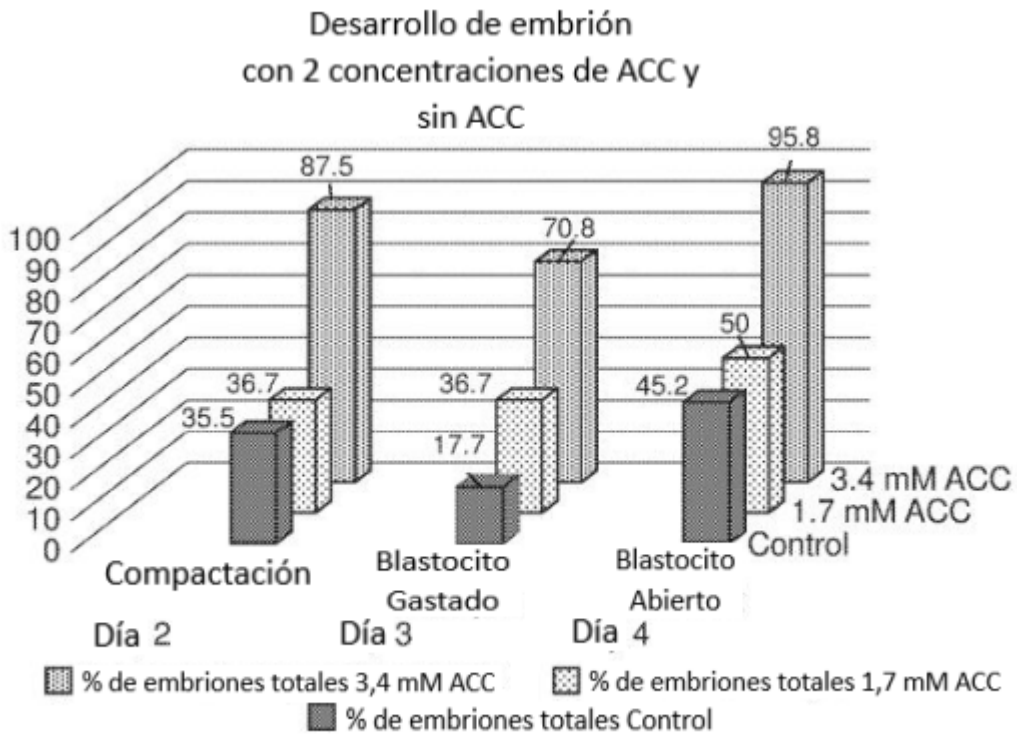


FIG. 10



FIG. 11

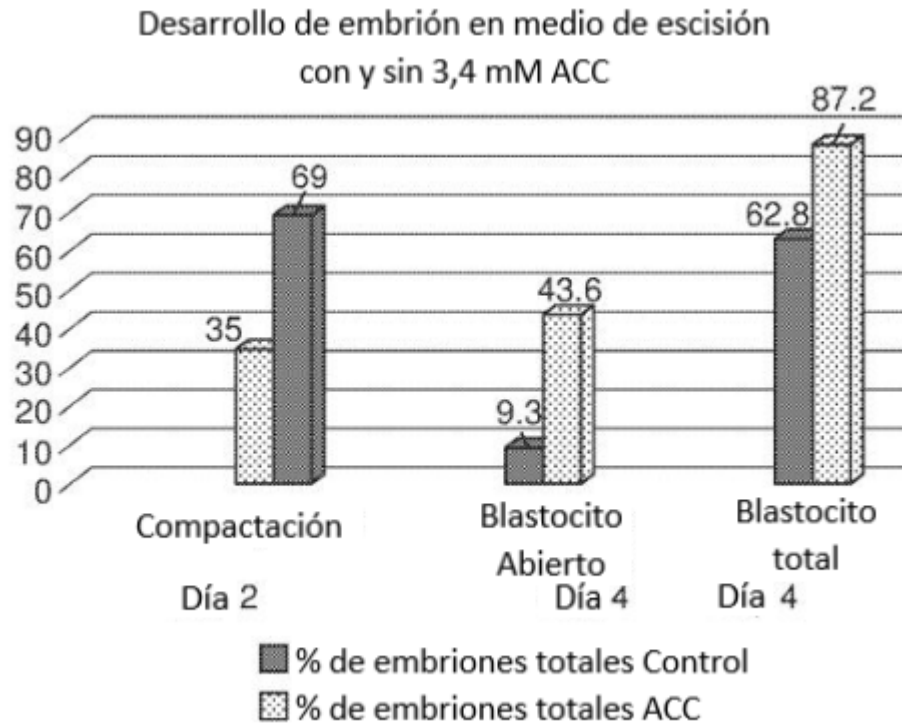


FIG. 12

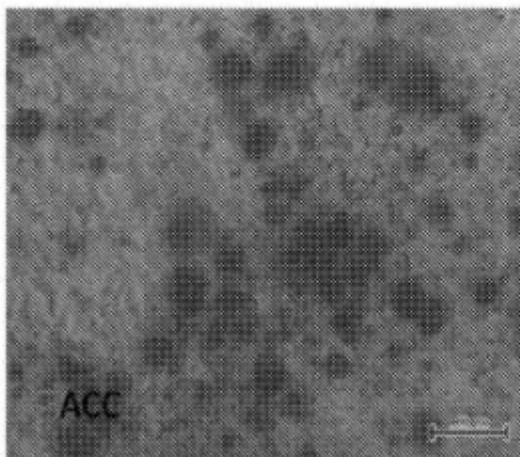


FIG. 13A

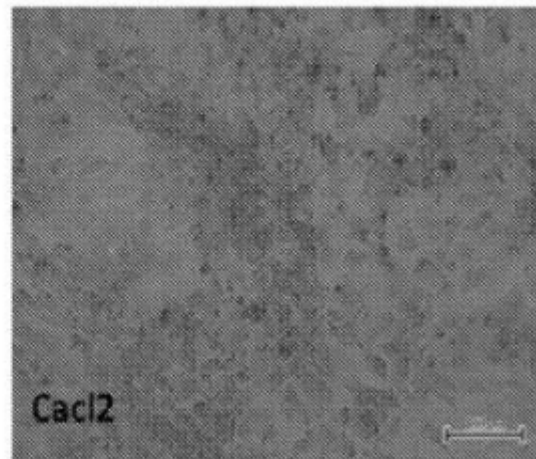


FIG. 13B

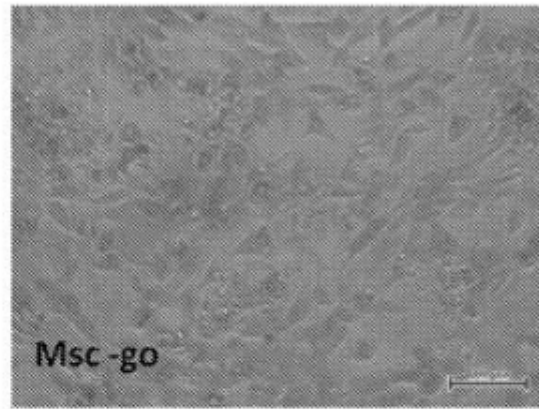


FIG. 13 C

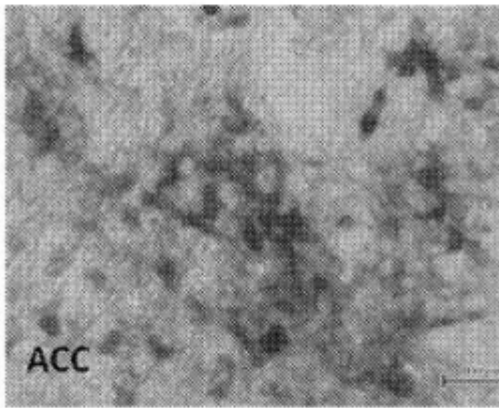


FIG. 14 A

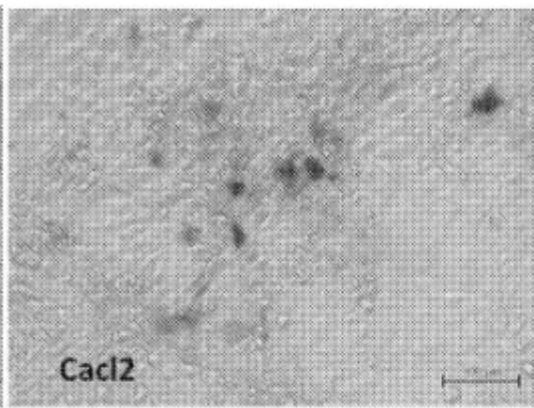


FIG. 14 B

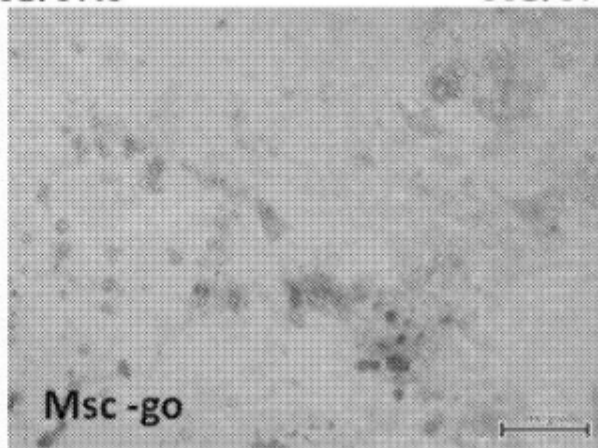


FIG. 14 C

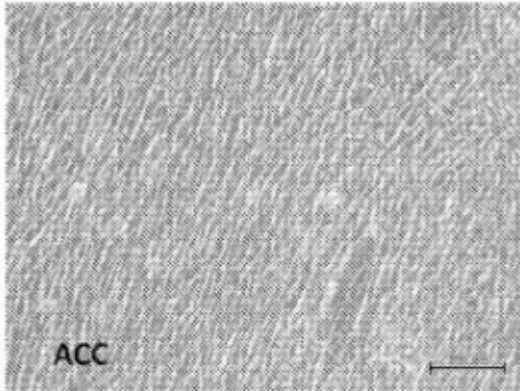


FIG. 15 A

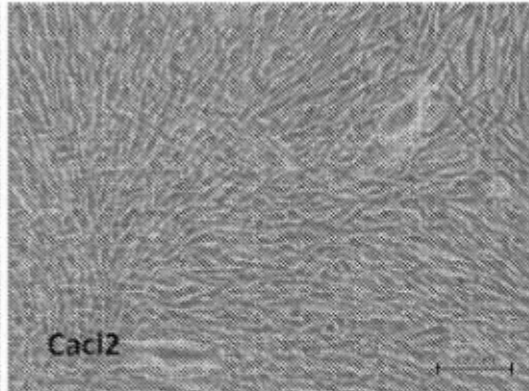


FIG. 15 B

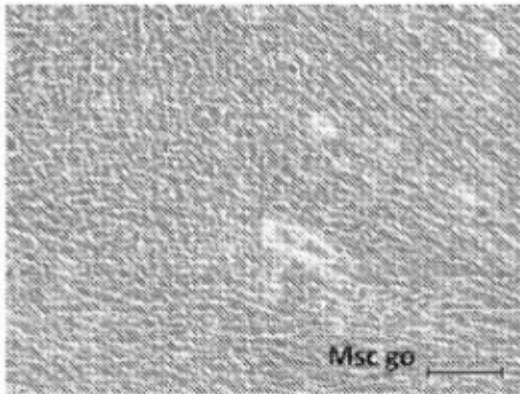


FIG. 15 C

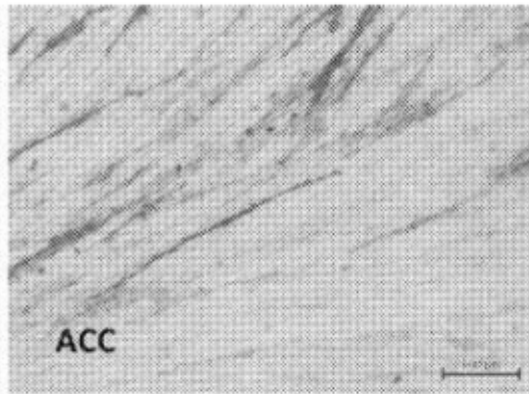


FIG. 15 D

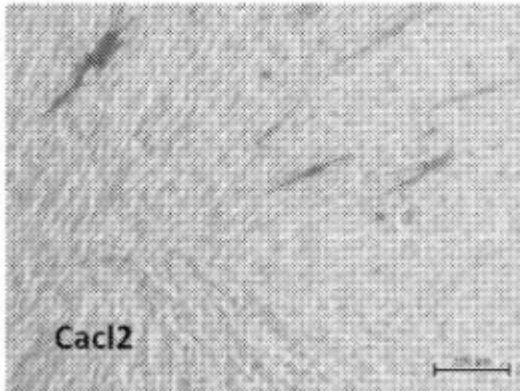


FIG. 15 E

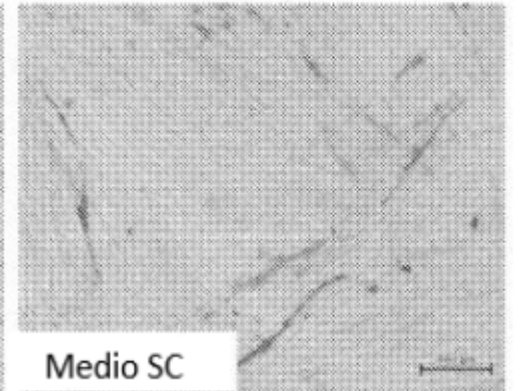


FIG. 15 F

FIG. 16A

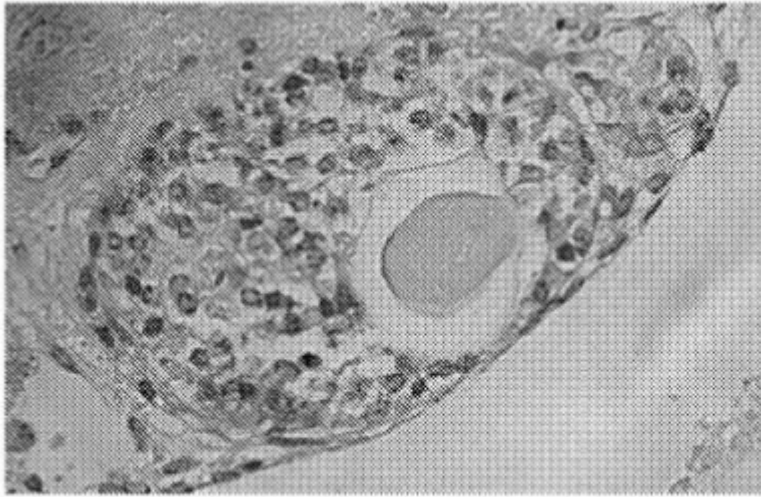


FIG. 16B

