(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108778295 A
(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201780017739.5

(22)申请日 2017.01.17

(30)优先权数据
62/279,843 2016.01.18 US
62/279,844 2016.01.18 US
62/279,845 2016.01.18 US
62/376,428 2016.08.18 US
62/434,453 2016.12.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2017/050058 2017.01.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/125917 EN 2017.07.27

(71)申请人 艾玛菲克有限公司
地址 以色列耐斯茨奥纳

(72)发明人 约瑟夫·本 亚伯拉罕·沙哈尔
阿米尔·阿拉夫

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 卓晓曦 郑霞

(51)Int.Cl.
A61K 33/06(2006.01)
A61K 33/10(2006.01)
A61K 31/66(2006.01)
C12N 5/00(2006.01)
C12N 5/04(2006.01)
C12N 5/073(2006.01)

权利要求书5页 说明书42页 附图11页

(54)发明名称

作为细胞培养基补充剂的稳定的无定形碳酸钙

(57)摘要

提供了作为细胞培养基的补充剂的稳定的无定形碳酸钙(ACC)和包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂。特别地,稳定的ACC可用于促进细胞和组织培养物、配子和胚胎的体外生长。

CN 108778295 A

1.一种细胞培养基,其中所述细胞培养基补充有由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),并且其中所述细胞培养基适合于生物培养物的生长。

2.如权利要求1所述的细胞培养基,其中所述生物培养物的生长选自所述生物培养物的增殖、成熟、繁殖、再生、冷冻保存或分化中的至少一种。

3.如权利要求1或2所述的细胞培养基,其中所述细胞培养基能够促进所述生物培养物的生长。

4.如权利要求1至3中任一项所述的细胞培养基,其中所述生物培养物选自真核生物细胞或原核生物细胞的培养物。

5.如权利要求4所述的细胞培养基,其中所述真核生物细胞的培养物选自动物细胞、植物细胞和昆虫细胞的培养物。

6.如权利要求5所述的细胞培养基,其中所述动物细胞的培养物选自人或非人哺乳动物的细胞培养物、组织培养物、器官培养物、干细胞、配子、胚胎和器官。

7.如权利要求6所述的细胞培养基,其中所述哺乳动物的细胞培养物选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞和血细胞培养物。

8.如权利要求5至7中任一项所述的细胞培养基,其中所述细胞的培养物是原代细胞培养物或选自有限细胞系和连续细胞系的细胞系。

9.如权利要求8所述的细胞培养基,其中所述细胞系选自FM3、HeLa、293、A-549、ALC、CHO、HB54、HL60、COS-7、HEK293、VERO、BHK、CV1、MDCK、3T3、C127、MRC-5、BAE-1、SH-SY5Y、L-929、HEP G2、NSO、U937、NAMALWA、WEHI 231、YAC 1和U 266B1细胞系。

10.如权利要求6所述的细胞培养基,其中所述哺乳动物的组织培养物选自上皮组织培养物、结缔组织培养物、肌肉组织培养物和神经组织培养物。

11.如权利要求10所述的细胞培养基,其中所述上皮组织培养物选自皮肤、胃和肠衬里、肾和腺体组织培养物,所述肌肉组织培养物选自平滑肌、骨骼肌和心肌组织培养物,并且所述神经组织培养物选自脑、脊髓和神经组织。

12.如权利要求6所述的细胞培养基,其中所述干细胞选自胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、NOM干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞。

13.如权利要求6所述的细胞培养基,其中所述胚胎是人胚胎或选自家畜动物、宠物和啮齿类动物胚胎的非人哺乳动物胚胎。

14.如权利要求6所述的细胞培养基,其中所述器官培养物或所述器官是卵巢,并且/或所述配子细胞选自卵母细胞或精子细胞。

15.如权利要求5所述的细胞培养基,其中所述植物细胞的培养物选自植物细胞和组织培养物;并且所述昆虫细胞的培养物选自昆虫细胞、组织和器官培养物。

16.如权利要求5和15中任一项所述的细胞培养基,其中所述培养基是选自生物流体、组织提取物和凝块的天然培养基;或者是选自平衡的盐溶液、基础培养基和复合培养基的人工培养基。

17.如权利要求16所述的细胞培养基,其中所述培养基是无血清培养基。

18.如权利要求16或17所述的细胞培养基,其中所述细胞培养基选自DMEM/F-12、卵裂培养基、DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、L-15培养基(Leibovitz)、MCDB培养基、培养基199、

opti-MEM、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、IPL-41昆虫培养基Sf-900、无血清昆虫培养基、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基、Ham氏F-12、Ham氏F-10、GMEM、Ames培养基、Eagle基本培养基(BME)、Claycomb、Click培养基、Glasgow最少必需培养基(GMEM)、MegaCell培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、Williams培养基E、Waymouth培养基、TC-10IPL-10培养基、用于精子分离、洗涤或成熟的培养基、用于受精、用于胚胎发育的培养基、和用于胚胎和/或配子冷冻保存的培养基。

19.如权利要求5所述的细胞培养基,其中所述真核生物细胞的培养物是酵母的培养物,所述细胞培养基选自YPD、YPG和YPAD。

20.如权利要求5所述的细胞培养基,其中适合于原核生物生长的细胞培养基选自LB和M9,并且任选地其中所述原核生物选自双歧杆菌属(Bifidobacterium)和乳酸杆菌属(Lactobacillus)。

21.如权利要求1至20中任一项所述的细胞培养基,其中所述稳定剂选自由以下组成的组:聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、二膦酸盐、糖类及其衍生物、蛋白、磷酸化的蛋白、天然和合成的生物聚合物及其衍生物、以及它们的任意组合。

22.如权利要求21所述的细胞培养基,其中所述稳定剂选自磷酸丝氨酸、三磷酸盐、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、植酸、柠檬酸、依替膦酸、焦磷酸盐、乙醇、六偏磷酸盐、几丁质以及它们的任意组合。

23.如权利要求1至22中任一项所述的细胞培养基,其中所述稳定的ACC的一次颗粒的平均直径为约10nm至约500nm。

24.如权利要求1所述的细胞培养基,其中所述稳定剂选自聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、二膦酸盐、有机酸以及它们的任意组合;并且所述细胞培养基适合于(i)肌肉、神经或骨细胞或组织培养物;(ii)人或非人哺乳动物胚胎;(iii)干细胞;(iv)配子;或(v)卵巢的生长。

25.如权利要求24所述的细胞培养基,其中所述细胞培养基能够促进(i)神经细胞再生;(ii)肌细胞形成;(iii)干细胞分化;(iv)卵母细胞或精子细胞成熟;(v)胚胎发育或(vi)胚胎或配子冷冻保存。

26.无定形碳酸钙(ACC),所述无定形碳酸钙(ACC)由至少一种稳定剂稳定,所述无定形碳酸钙(ACC)用于作为细胞培养基的补充剂使用。

27.无定形碳酸钙(ACC),所述无定形碳酸钙(ACC)被配制作为用于细胞培养基的补充剂,其中所述ACC由至少一种稳定剂稳定。

28.一种细胞培养基补充剂,所述细胞培养基补充剂包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)。

29.一种试剂盒,所述试剂盒包含:

(i)如权利要求26或27所述的稳定的ACC;

(ii)如权利要求28所述的补充剂;或

(iii)氯化钙、碳酸钠、至少一种稳定剂和用于从所述氯化钙、碳酸钠和至少一种稳定剂制备稳定的ACC的说明书;以及

用于将所述稳定的ACC或所述补充剂与细胞培养基组合使用的说明书。

30.如权利要求29所述的试剂盒,所述试剂盒还包含细胞培养基。

31.如权利要求26或27所述的ACC、如权利要求28所述的补充剂或如权利要求29或30所述的试剂盒，其中所述细胞培养基适合于生物培养物的生长。

32.如权利要求31所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述生物培养物的生长选自所述生物培养物的增殖、成熟、繁殖、再生、发育、冷冻保存和分化中的至少一种。

33.如权利要求31或32所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述ACC能够促进所述生物培养物的生长。

34.如权利要求31至33中任一项所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述生物培养物选自真核生物细胞或原核生物细胞的培养物。

35.如权利要求34所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述真核生物细胞的培养物选自动物细胞、植物细胞、昆虫细胞和酵母的培养物。

36.如权利要求35所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述动物细胞的培养物选自人或非人哺乳动物的细胞培养物、组织培养物、器官培养物、干细胞、胚胎、配子和器官；所述植物细胞的培养物选自植物细胞培养物和植物组织培养物；并且所述昆虫细胞的培养物选自昆虫细胞、组织和器官培养物。

37.如权利要求36所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中(i)所述哺乳动物的细胞培养物选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞和血细胞培养物；(ii)所述哺乳动物的组织培养物选自上皮组织培养物、结缔组织培养物、肌肉组织培养物和神经组织培养物；(iii)所述干细胞选自胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞；(iv)所述胚胎是人胚胎或选自家畜动物、宠物和啮齿类动物胚胎的非人哺乳动物胚胎；(v)所述配子选自卵母细胞和精子细胞；或(vi)所述器官培养物或所述器官是卵巢。

38.如权利要求36或37所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中(i)所述细胞的培养物是原代细胞培养物或选自有限细胞系和连续细胞系的细胞系，任选地其中所述细胞系选自FM3、HeLa、293、A-549、ALC、CHO、HB54、HL60、COS-7、HEK293、VERO、BHK、CV1、MDCK、3T3、C127、MRC-5、BAE-1、SH-SY5Y、L-929、HEP G2、NSO、U937、NAMALWA、WEHI 231、YAC 1和U 266B1细胞系；或(ii)所述上皮组织培养物选自皮肤、胃和肠衬里、肾和腺体组织培养物，所述肌肉组织培养物选自平滑肌、骨骼肌和心肌组织培养物，所述神经组织培养物选自脑、脊髓和神经组织。

39.如权利要求26至38中任一项所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述细胞培养基选自(i)天然培养基，所述天然培养基选自生物流体、组织提取物和凝块；(ii)人工培养基，所述人工培养基选自平衡的盐溶液、基础培养基和复合培养基，其中所述人工培养基任选地是无血清培养基；(iii)适合于原核生物的生长的培养基，所述培养基选自YT和M9；和(iv)适合于酵母的生长的培养基，所述培养基选自YPD、YPG和YPAD。

40.如权利要求39所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述细胞培养基选自DMEM/F-12、卵裂培养基、DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、L-15培养基(Leibovitz)、MCDB培养基、培养基199、opti-MEM、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、IPL-41昆虫培养基Sf-900、无血清昆虫培养基、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基、Ham氏F-12、Ham氏F-10、GMEM、Ames培养基、Eagle基本培养基(BME)、Claycomb、Click培养基、Glasgow最少必需培养基(GMEM)、MegaCell培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、

Williams培养基E、Waymouth培养基、TC-10IPL-10培养基、用于精子分离、洗涤或成熟的培养基、用于受精的培养基、用于胚胎发育的培养基、和用于胚胎或/和配子冷冻保存的培养基。

41.如权利要求26至40中任一项所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、二膦酸盐、糖类、其衍生物、蛋白、磷酸化的蛋白、天然和合成的生物聚合物及其衍生物、以及它们的任意组合。

42.如权利要求26至41中任一项所述的ACC、补充剂或试剂盒，其中所述稳定的ACC的一次颗粒的平均直径为约10nm至约500nm。

43.一种用于促进生物培养物的生长的方法，包括将所述生物培养物暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC。

44.如权利要求43所述的方法，其中促进所述生物培养物的生长选自促进所述生物培养物的增殖、成熟、繁殖、再生、分化或发育中的至少一种。

45.如权利要求44所述的方法，其中所述生物培养物选自哺乳动物细胞培养物、组织培养物和器官培养物。

46.如权利要求43至45中任一项所述的方法，其中所述细胞培养物选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞、配子细胞和血细胞培养物；所述哺乳动物组织培养物选自上皮组织培养物、结缔组织培养物、肌肉组织培养物和神经组织培养物；并且所述器官培养物选自卵巢。

47.如权利要求46所述的方法，包括促进肌管的形成。

48.如权利要求47所述的方法，还包括减少早期发育的肌管的收缩活动的开始。

49.如权利要求47或48所述的方法，其中由所述肌管形成的肌细胞选自骨骼肌细胞和心肌细胞。

50.如权利要求46所述的方法，包括加速神经细胞再生。

51.如权利要求46所述的方法，包括体外促进胚胎发育。

52.如权利要求51所述的方法，其中促进胚胎发育包括增加达到发育阶段的胚胎的比例和/或达到发育阶段的时间，其中所述发育阶段选自由致密化、胚泡形成和胚泡孵化阶段组成的组。

53.如权利要求51或52所述的方法，其中所述胚胎是人或非人哺乳动物胚胎。

54.如权利要求53所述的方法，其中所述非人哺乳动物胚胎选自由家畜动物、家养宠物、啮齿类动物和灵长类动物胚胎组成的组。

55.如权利要求46所述的方法，包括加速干细胞分化和/或增殖。

56.如权利要求46所述的方法，包括促进选自卵母细胞和精子细胞的配子的成熟和/或保存。

57.如权利要求56所述的方法，其中促进精子细胞的成熟包括促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。

58.如权利要求43至57中任一项所述的方法，其中将所述生物培养物暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC包括将所述ACC添加到细胞培养基中。

59.如权利要求43至58中任一项所述的方法，其中所述稳定剂选自由以下组成的组：聚

磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、二膦酸盐、糖类及其衍生物、蛋白、肽、磷酸化的蛋白或肽、天然和合成的生物聚合物及其衍生物、以及它们的任意组合。

60.如权利要求59所述的方法，其中所述稳定剂选自磷酸丝氨酸、三磷酸盐、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、植酸、柠檬酸、依替膦酸、焦磷酸盐、乙醇、六偏磷酸盐、几丁质以及它们的任意组合。

61.如权利要求43至60中任一项所述的方法，其中所述稳定的ACC的一次颗粒的平均直径为约10nm至约500nm。

作为细胞培养基补充剂的稳定的无定形碳酸钙

发明领域

[0001] 本发明提供作为细胞培养基的补充剂的稳定的无定形碳酸钙。特别地，ACC可用于促进细胞和组织培养物的体外生长。在本发明的另外的方面，提供了包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂。

[0002] 发明背景

[0003] 当提供适当的营养和条件时，细胞培养技术允许从组织中移出的动物、植物或昆虫细胞在体外生长。细胞培养技术具有许多应用，包括细胞过程的研究、评估各种化学化合物或药物对特定细胞类型的作用、以工业规模合成有价值的生物制品以及用于移植目的的扩增的细胞的产生。细胞培养技术被用于体外受精、干细胞研究和疫苗生产。

[0004] 细胞培养技术最重要的用途之一是生物制品包括特定蛋白质例如单克隆抗体的大量生产。这样的具有商业价值的生物制品的数量在过去几十年中迅速增加，并且导致了目前对哺乳动物细胞培养技术的广泛兴趣。

[0005] 用于培养细胞的培养基的组成非常重要，因为它对细胞存活、增殖和感兴趣的生物制品的生产具有影响。开发了许多不同的对细胞培养物具有不同水平特异性的细胞培养基。一些培养基是基础培养基，其可以根据不同细胞培养物的需要进行补充，另一些是较复杂的培养基。可以向细胞培养基中添加数百种个体化合物，以获得期望的效果。但是培养基补充的概念通常限于物质的添加，所述物质通常推动细胞培养物的建立和维持。最常用的补充剂为矿物质、维生素、氨基酸、激素和血清，最常见的是胎牛血清、马血清或人血清。然而，由于血清的使用在许多情况下可能是不期望的，所以使用血清含量降低的生长培养基或无血清培养基。

[0006] 目前正在进行培养基的研究和开发，并且特别是允许细胞和组织培养物的支持和增殖、特别是提供有益的大规模生产培养物条件的培养基的补充剂的研究和开发。

[0007] 发明概述

[0008] 令人惊讶地发现，与补充有其他钙源的培养基中生长的细胞相比，补充有稳定的无定形碳酸钙(ACC)的细胞培养基提供了各种细胞的增强的生长。特别地，观察到了稳定的ACC促进了mdx细胞中肌管的形成，所述mdx细胞为杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy)的模型。此外，在包含稳定的ACC的培养基中观察到胚胎的促进的体外发育，所述培养基是“一步”的单培养培养基或“连续的”培养基(卵裂培养基(Cleavage medium))。令人惊讶地发现，在补充有稳定的ACC的卵裂培养基中生长的胚胎显示出快速的卵裂和较高的孵化率。在其他情况下，在补充有ACC的培养基中生长的神经细胞显示出增强的神经丝再生，并且在补充有ACC的培养基中生长的干细胞展示出更快的扩增和分化。还令人惊讶地发现，在ACC的存在下孵育的精子在上游程序(swim-up procedure)后展示出高得多的运动性，并且在上相中与ACC一起孵育的精子细胞(运动的精子)的浓度多达未处理样品中的浓度的7倍高。此外，已经表明ACC对精子运动性没有双相作用，这是在向精子样品中添加Ca^{2+}离子后观察到的。所有这些观察结果表明，稳定的ACC作为细胞培养基的补充剂，促进和推动细胞生长并提供更好的功能。

[0009] 在一方面，本发明提供一种细胞培养基，其中所述细胞培养基补充有由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)，并且其中所述细胞培养基适合于生物培养物的生长。根据一些实施方案，培养基适合于生长细胞的培养物、组织培养物、器官培养物或器官。根据其他实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进或推动生长，例如促进细胞、组织和器官的增殖、成熟、繁殖、再生、发育、保存例如冷冻保存和/或分化。根据一个实施方案，细胞是动物、植物或昆虫细胞。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基适合于细胞培养物、组织培养物、器官培养物的生长，并且任选地能够促进细胞培养物、组织培养物、器官培养物的生长，其中所述培养物是动物、植物或昆虫的细胞、组织或器官培养物。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基适合于干细胞例如胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、鼻嗅粘膜(NOM)干细胞、成体组织特异性干细胞和诱导的多能干细胞的生长，或者适合于胚胎例如人或非人哺乳动物胚胎的生长。在其他实施方案中，这样的细胞培养基能够促进干细胞增殖、扩增和/或分化，能够促进配子成熟或能够促进胚胎的发育。根据一些实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基适合于酵母或细菌的生长，并且任选地能够促进酵母或细菌的生长。在一些实施方案中，细菌是大肠杆菌(E.coli)或益生菌，例如双歧杆菌属(Bifidobacterium)和乳酸杆菌(Lactobacillus)属的细菌。根据上述实施方案中的任何一个，本发明的细胞培养基可以是适合于细胞的生长的任何培养基，例如包含生物流体的天然培养基或人工培养基例如平衡的盐溶液、基础培养基或复合培养基。本发明的细胞培养基可以如本领域已知的进一步被补充。根据本发明，细胞培养基补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC。稳定剂可以是本领域已知的任何剂。在特定的实施方案中，稳定剂选自聚磷酸盐例如无机聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、二膦酸盐、有机酸以及它们的任意组合。根据一些实施方案，稳定剂是所述稳定剂的组合，例如无机聚磷酸盐与有机酸例如柠檬酸的组合或磷酸化的氨基酸与有机酸的组合。

[0010] 根据另一方面，本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)，用于作为细胞培养基的补充剂使用。根据一个实施方案，稳定的ACC在培养基制备期间被添加到培养基中。根据另一个实施方案，ACC在使用前被添加到培养基中。

[0011] 根据又另一方面，本发明提供了细胞培养基补充剂，其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)。根据一个实施方案，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂在培养基制备期间被添加到培养基中。根据另一个实施方案，补充剂在使用前被添加到培养基中。细胞培养基补充剂可以是固体、液体或半液体补充剂。根据上述实施方案中的任何一个，ACC由至少一种稳定剂稳定。这样的细胞培养基补充剂能够促进细胞、组织和器官的生长，例如促进细胞、组织和器官的增殖、成熟、繁殖、再生、发育和/或分化。

[0012] 根据另一方面，本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的并被配制作为细胞培养基补充剂的无定形碳酸钙(ACC)，其中所述ACC由至少一种稳定剂稳定。

[0013] 根据另一方面，本发明提供了用于促进生物培养物的细胞生长的方法，包括将所述生物培养物暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC。根据一些实施方案，生物培养物选自细胞的培养物、细胞培养物、组织培养物、器官培养物和细菌培养物。在一个实施方案中，该方法包括促进细胞生长，并且特别是促进肌管的形成、促进胚胎发育、促进神经细胞再生和促进配子的成熟和/或保存。

[0014] 根据一个方面，本发明提供了包含以下的试剂盒：ACC，所述ACC用于作为本发明的细胞培养基的补充剂使用；或包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂；以及用于所述ACC或所述补充剂与细胞培养基组合使用的说明书。根据某些方面，本发明提供了包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)以及用于所述ACC与细胞培养基组合使用的说明书的试剂盒。根据一个实施方案，ACC用于作为细胞培养基补充剂使用。根据一些实施方案，试剂盒包括含有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基补充剂和用于所述ACC与细胞培养基组合使用的说明书。本发明的试剂盒还可以包含任何已知的适合细胞、组织或器官生长的培养基。

[0015] 附图简述

[0016] 图1示出了不同钙源对从培养的脊髓背根神经节(SC-DRG)切片的神经元发芽(sprouting)的影响。从暴露于以下钙化合物(Ca^{2+}浓度2mM)的从SC-DRG切片生长的神经纤维的免疫荧光染色(抗神经丝抗体)：(A)ACC-依替膦酸；(B)ACC-磷酸丝氨酸；(C)胃石；(D)结晶碳酸钙(CCC)；和(E)$CaCl_2$溶液(对照)。原始放大倍数X100。

[0017] 图2示出了(A)由依替膦酸稳定的ACC和(B)$CaCl_2$溶液(对照)对从在壳聚糖微载体(MC)上培养的脑细胞的神经元发芽的影响。呈现了在2mM的ACC-依替膦酸或$CaCl_2$的存在下培养30天后，从脑细胞-壳聚糖MC聚集体生长的神经纤维(抗神经丝抗体)的免疫荧光染色。

[0018] 图3示出了ACC对健康骨骼肌培养物中肌管形成的影响。原始放大倍数x40。将骨骼肌培养物暴露于以下钙化合物(最终Ca^{2+}浓度2mM)：ACC-依替膦酸；ACC-ADP；胃石；结晶碳酸钙(CCC)；和$CaCl_2$溶液(对照)。培养物在4天和7天后固定并用姬姆萨(Giemsa)染色。在ACC处理的细胞中观察到由骨骼肌培养物的肌管形成的促进。

[0019] 图4示出了在培养基中的ACC对mdx细胞系培养物中肌管早期形成的影响。示出了暴露于含有$CaCl_2$、ACC-ET和ACC-磷酸丝氨酸(ACC-PS)的培养基的培养物的姬姆萨染色。原始放大倍数X100。

[0020] 图5示出了如在暴露于两种ACC制备物(ACC-ET和ACC-PS)以及$CaCl_2$的mdx肌细胞系中测量的肌酐激酶(CK)水平。

[0021] 图6示出了ACC(ACC-PS、ACC-PP以及对照($CaCl_2$))对mdx小鼠原代培养物中肌管形成的影响(姬姆萨染色；原始放大倍数X50)。

[0022] 图7示出了通过肌球蛋白免疫染色展示的ACC对mdx小鼠原代培养物中肌管形成的影响；对照($CaCl_2$)；ACC-PS，ACC-聚磷酸盐(ACC-PP)。原始放大倍数X100。

[0023] 图8示出了稳定的ACC对小鼠胚胎体外发育的影响。

[0024] 图9示出了培养10天后的成骨细胞的茜素红染色随各种培养基处理的变化。培养基中补充有额外的1mM Ca^{2+}，其来自：A-ACC、B-$CaCl_2$、或C-对照，无Ca^{2+}添加。

[0025] 图10示出了培养10天后的成骨细胞的碱性磷酸酶染色随各种培养基处理的变化。培养基c补充有额外的1mM Ca^{2+}，其来自：A-ACC、B-$CaCl_2$、或C-对照，无Ca^{2+}添加。

[0026] 图11示出了在添加了不同来源的额外的1mM Ca^{2+}的培养基中生长的mdx细胞系的茜素红(A-C)和碱性磷酸酶(D-F)染色：A和D-ACC、B和E-$CaCl_2$、或C和F-对照(无额外的钙的补充剂)。

[0027] 图12示出了在体外培养的卵巢中稳定的ACC的效果(A)，其中卵母细胞周围的颗粒细胞是完整的，以及对照(B)(培养基中无ACC)，其中未观察到完整的颗粒细胞和处于生发

泡阶段的卵母细胞。

[0028] 发明详述

[0029] 令人惊讶地发现，向细胞培养基中添加ACC促进各种类型细胞的生长。根据一个方面，本发明提供了补充有无定形碳酸钙(ACC)的细胞培养基，其中所述ACC由至少一种稳定剂稳定。根据其他方面，本发明提供了稳定的ACC，用于作为细胞培养基的补充剂使用。在某些方面，本发明提供了包含稳定的ACC的细胞培养物补充剂。

[0030] 对于本发明的每个方面，单独地和共同地使用以下术语，且具体参数如下定义：

[0031] 术语“细胞培养基”、“生长培养基”和“培养基”在本文中可互换使用，并且指用于、适合于或能够支持生物培养物例如细胞、组织或器官的生长并为所述细胞、组织或器官提供适当环境的培养基。不同的细胞培养基可具有不同的性质并且包含不同的组分，然而几乎所有的培养基是等渗培养基，并且具有适合于细胞生长的渗透压。因此，细胞培养基是等渗细胞培养基。如本文所用的术语“等渗”是指在37℃具有在270-300mOsmol/kg范围内的水溶液的渗透压的细胞培养基。因此，在一个实施方案中，水或更具体地去离子水本身不被认为是细胞培养基。根据一些实施方案，组织培养物包含氯化钠、氯化钾和磷源，例如磷酸钠单碱或二碱。根据一些实施方案，培养基适合于生长细胞培养物、组织培养物、器官培养物或器官。细胞可以是真核细胞或原核细胞。具体而言，细胞培养基是指适合于真核细胞培养物、组织培养物或器官培养物生长的培养基。在一些特定的实施方案中，培养基可以是完全培养基、基础培养基、补充有细胞培养基补充剂的基础培养基、具有各种量的血清的培养基或化学限定(chemically defined)培养基。

[0032] 如本文所用的术语“补充”是指添加了用至少一种稳定剂稳定的ACC的培养基，因此该培养基包含用至少一种稳定剂稳定的ACC。该术语涵盖用ACC制备的培养基和在使用前加入ACC的培养基。

[0033] 因此，在一个实施方案中，本发明提供一种细胞培养基，其中所述细胞培养基补充有由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)，并且其中所述细胞培养基适合于生物培养物的生长。

[0034] 术语“培养物”、“生物培养物”和“细胞的培养物”在本文中可互换使用，并且指在预先定义的条件中体外生长的细胞、组织、器官培养物或器官。在一些实施方案中，生物培养物选自动物、植物或昆虫细胞培养物；动物、植物或昆虫组织培养物；动物、植物或昆虫器官培养物、酵母培养物和细菌培养物。

[0035] 如本文所用的术语“细胞培养物”是指在人工体外环境中维持、培养或生长的多细胞真核生物的细胞。细胞培养物可以是悬浮培养物，在其中细胞在液体培养基中通过持续搅拌培养或在微载体上或者是贴壁或单层培养物上培养。

[0036] 如本文所用的术语“组织培养物”是指在体外维持或生长的组织。

[0037] 如本文所用的术语“器官培养物”是指体外培养的器官的部分或整个器官。

[0038] 术语“干细胞”是指具有增殖和分化成不同细胞类型能力的细胞。

[0039] 术语“无定形碳酸钙”和“ACC”在本文中可互换使用，并且是指由至少一种稳定剂稳定的非结晶形式的碳酸钙。ACC可以从天然来源获得或化学合成。该术语还包括自然稳定的ACC，例如从胃石获得的ACC。

[0040] 如本文所用的术语“天然ACC”是指任何从天然来源分离或衍生的ACC。天然来源的

ACC的非限制性实例包括淡水甲壳类动物的胃石。

[0041] 如本文所用的术语“合成ACC”是指任何由人离体产生和/或衍生的ACC。

[0042] 根据一些实施方案，根据本发明的细胞培养基适合于生物培养物的生长。根据一个实施方案，生物培养物是真核生物或原核生物细胞的培养物。如本文所用的术语“生长”涵盖下列任何一种：增殖、成熟、繁殖、再生、支持、分化、发育、保存、冷冻保存以及它们的任意组合，并且可以根据细胞类型而不同地使用。根据一个实施方案，细胞培养基适合于细胞的支持、增殖或繁殖。在一个示例性实施方案中，细胞培养基适合于真核细胞，例如单细胞生物或多细胞生物的细胞的增殖或繁殖。根据另一个示例性实施方案，细胞培养基适合于原核细胞的增殖或繁殖。根据其他实施方案，细胞培养基适合于细胞的成熟和/或发育，例如胚胎的发育或配子细胞的成熟。如本文所用的术语“胚胎”是指哺乳动物受精的卵母细胞，即合子，以及指从所述合子发育的在其最早发育阶段的多细胞生物。术语“配子”或“配子细胞”在本文中可互换使用，并且指能够启动新二倍体个体的形成的任何雄性或雌性生殖细胞。配子的实例是精子和卵母细胞。如本文所用的术语“精子”和“精虫”可互换使用，指雄性生殖细胞。术语“精子样品”是指包含精子的一种或更多种样品。精子样品可以是从受试者获得的精液或处理过的精液、液化的精液、沉淀的和任选地再悬浮的精子等。根据一些实施方案，细胞培养基适合于细胞的再生，例如神经细胞的再生。如本文所用的术语“神经元再生”和“神经再生”可以互换使用，并指受损神经的功能的恢复。具体而言，它包括通过神经的信号传递的恢复，所述恢复通过修复受损部位、外周或中枢神经系统轴突和树突神经元纤维的再生长。在一些实施方案中，神经再生是指从受损的神经元纤维发芽。在一些实施方案中，神经再生是指从受损的神经元纤维发芽。因此，根据本发明的细胞培养基能够推动深层(profound)神经纤维再生。根据另一个实施方案，细胞培养基适合于细胞的分化，例如干细胞的分化，和特别是干细胞向成骨细胞的分化。根据一些实施方案，细胞培养基适合于支持组织培养物和器官培养物的增殖。根据一些实施方案，细胞培养基适合于器官的体外保存。

[0043] 根据一些实施方案，根据本发明的补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进生物培养物的如上所定义的生长。如本文所用的术语“促进”是指推动(promoting)、改进(improving)、增强(augmenting)、改善(ameliorating)，典型地增加生长参数。根据本发明的一些实施方案，术语“能够促进”和“促进”可互换使用。可以相对于在相同条件中但无ACC地生长的对照样品来测量促进。因此，在一个实施方案中，根据本发明的补充有稳定ACC的细胞培养基能够促进细胞、组织或器官的增殖、成熟、繁殖、再生、发育、冷冻保存和/或分化。根据一个实施方案，细胞培养基能够促进干细胞的分化。根据另一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进细胞的增殖。根据又另一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进细胞的成熟。根据另外的实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进细胞或组织的发育。根据某些实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进细胞再生。细胞、组织或器官的增殖、成熟、繁殖、再生、发育和/或分化的促进可以作为与上文定义的对照相比的促进百分比来测量。因此，根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。提高100％意味着参数(例如增殖)增加到2倍；提高200％意味着参数(例如胚胎发育)增加到3倍，等等。根

据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0044] 根据一些实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基适合于真核生物细胞培养物，例如真核生物细胞、组织或器官培养物的生长和任选地促进其生长。根据一些实施方案，补充有稳定ACC的细胞培养基用于真核生物细胞的生长。根据一些实施方案，真核生物细胞的培养物选自动物、植物和昆虫细胞的培养物。

[0045] 根据一个实施方案，真核生物细胞的培养物、组织或器官培养物是动物细胞、组织或器官培养物、干细胞、胚胎和器官。根据一些实施方案，动物是人或非人哺乳动物。因此，根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基适合于哺乳动物细胞、组织或器官培养物、哺乳动物干细胞、哺乳动物胚胎或哺乳动物器官的生长和任选地促进其生长。

[0046] 根据一个实施方案，哺乳动物是人，因此根据一个实施方案，根据本发明的细胞培养基适合于人细胞的培养物、组织或器官培养物、干细胞、胚胎或器官的生长。

[0047] 根据另一个实施方案，哺乳动物是非人哺乳动物。根据一个实施方案，非人哺乳动物是家畜动物，例如牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛或骆驼。在另一个实施方案中，非人哺乳动物是家养宠物，例如猫或狗；啮齿类动物，例如小鼠、大鼠、豚鼠或仓鼠；兔形目动物，例如兔；或者灵长类动物，例如猴(例如猕猴)或猿(例如黑猩猩)。

[0048] 根据一些实施方案，根据本发明的细胞培养基适合于哺乳动物细胞培养物的生长。根据一些实施方案，哺乳动物细胞培养物，人或非人哺乳动物细胞培养物选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞、配子和血细胞的细胞培养物。根据一个实施方案，细胞培养物是肌细胞培养物。根据另一个实施方案，细胞培养物是神经细胞培养物。根据另外的实施方案，细胞培养物是骨或骨细胞的细胞培养物。根据一个实施方案，细胞培养物是骨髓细胞培养物。根据另一个实施方案，细胞培养物是肿瘤或癌细胞。根据一些实施方案，根据本发明的补充有ACC的细胞培养基能够促进所述细胞培养物的生长。根据一些实施方案，细胞培养物是悬浮或贴壁细胞培养物。

[0049] 根据一些实施方案，细胞培养物是原代培养物。如本文所用的术语“原代培养物”是指从组织中分离并在适当条件下增殖的细胞。

[0050] 根据另一个实施方案，细胞培养物是细胞系。术语“传代培养物”和“细胞系”在本文中可互换使用，并且是指亚培养的原代培养物，即从一个培养容器转移到另一个培养容器的原代培养物。根据一些实施方案，细胞系是有限细胞系，即具有有限寿命并且经历有限数量的细胞世代的细胞系。根据另一个实施方案，细胞系是连续细胞系，即获得无限分裂能力的永生细胞系。

[0051] 根据一个特定的实施方案，细胞系选自FM3、HeLa、293、A-549、ALC、CHO、HB54、HL60、COS-7、HEK293、VERO、BHK、CV1、MDCK、3T3、C127、MRC-5、BAE-1、SH-SY5Y、L-929、HEPG2、NSO、U937、NAMALWA、WEHI 231、YAC 1和U 266B1细胞系。根据一些实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进所述细胞系的生长。

[0052] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于哺乳动物组织培养物的生长。根据一个实施方案，哺乳动物组织培养物是人组织培养物。根据另一个实施方案，组织培养物是非人哺乳动物组织培养物。根据一个实施方案，组织培养物选自上皮组织、结缔组织、肌肉组织和神经组织培养物。根据一个实施方案，组织培养物是神经组织培养物。根据另一个

实施方案，组织培养物是肌肉组织培养物。根据又另一个实施方案，组织培养物是上皮组织培养物，例如鼻嗅粘膜。根据另外的实施方案，组织培养物是骨组织培养物。

[0053] 根据一些更特定的实施方案，组织培养物选自肾、肝、腺、脑、骨、眼和肌肉组织培养物。根据一个实施方案，上皮组织培养物选自皮肤、胃和肠衬里、肾和腺体组织培养物，所述肌肉组织培养物选自平滑肌、骨骼肌和心肌组织培养物，所述神经组织培养物选自脑、脊髓和神经组织。

[0054] 根据一些实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进所述组织培养物的生长。在一个实施方案中，这样的培养基能够促进神经组织培养物的再生。在一些实施方案中，培养基能够以约10％至约200％、约20％至约150％、约30％至约120％或约40％至约100％促进神经培养物的再生。在其他实施方案中，这样的培养基能够促进肌管的形成和/或促进或推动肌细胞的收缩性的开始，例如也减少肌管自发收缩活动开始的时间。在一个实施方案中，培养基能够以约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％促进肌管的形成。如本文所用的术语“肌管形成”是指成肌细胞融合成多核纤维--肌管的过程。

[0055] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于干细胞生长。根据一些实施方案，干细胞是人干细胞。根据另一个实施方案，干细胞是非人哺乳动物干细胞。根据一些实施方案，干细胞选自胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞。根据一个实施方案，干细胞是胚胎干细胞。根据另一个实施方案，干细胞是造血干细胞。根据另一个实施方案，干细胞是间充质干细胞。根据又另一个实施方案，干细胞是多能干细胞。根据一些实施方案，干细胞是成体干细胞，例如间充质干细胞、表皮干细胞、上皮干细胞、造血干细胞或神经干细胞。根据一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于干细胞的增殖、扩增和/或分化。根据另一个实施方案，本发明的细胞培养基能够促进干细胞的增殖和/或分化。根据一个特定的实施方案，本发明的细胞培养基能够促进干细胞向成骨细胞的分化，即促进成骨细胞分化。

[0056] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于胚胎的生长。根据一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于胚胎的发育。根据另一个实施方案，本发明的细胞培养基能够促进胚胎的发育。根据一个实施方案，培养基能够促进胚胎发育约10％至约300％、约20％至约250％、约30％至约200％、约40％至约150％、约60％至约100％或约70％至约90％。术语“胚胎发生(embryogenesis)”和“胚胎发育(embryo development)”在本文中可互换使用，并且是指，如本领域已知的，胚胎从合子阶段形成并发育以成为胚胎的过程，并且包括到达卵裂、致密化、胚泡形成或胚泡孵化阶段的阶段。本文所用术语“卵裂(cleavage)”、“致密化(compaction)”、“胚泡(blastocyst)”和“孵化”是指胚胎学中常规使用的术语。术语“卵裂”是指早期胚胎中细胞的分裂。产生与原始合子大小相同的细胞簇。来源于卵裂的不同细胞称为卵裂球(blastomere)。如本文所用的术语“致密化(compaction)”是指这样一个阶段，其中来自合子的分裂细胞通过极化和粘附使它们彼此的接触最大化，形成通过紧密连接保持在一起的致密的球。如本文所用的术语“胚泡”是指在致密化阶段之后形成的结构，并且包含随后形成胚胎的内部细胞团和包围内部细胞团的胚泡外层以及称为胚泡腔(blastocoele)的流体填充腔。如本文所用的术语“孵化”是指胚胎通过其外壳(透明带(zona pellucida))出现的阶段。

[0057] 如本文所用的术语“促进胚胎发育”是指推动、促进或改进发育过程的速率和/或效力以及成功生长和发育的胚胎的比例。促进是通过相对于经历相同程序但生长培养基中没有ACC的对照样品来测量的。根据一个实施方案，胚胎是人胚胎。根据另一个实施方案，胚胎是非人哺乳动物胚胎。在一些实施方案中，非人哺乳动物选自牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛或骆驼。在一些其他实施方案中，非人哺乳动物选自猫、狗、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猴或猿。

[0058] 根据一些实施方案，如上所述，细胞培养基能够改进或延长胚胎或配子的冷冻保存。如本文所用，术语“冷冻保存”是指在超低温，通常在液氮(-196℃)中储存细胞，例如胚胎的配子。

[0059] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于配子细胞生长。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基适合于配子细胞的成熟和/或保存。根据一个实施方案，配子细胞是卵母细胞。根据另一个实施方案，配子细胞是精子细胞。根据上述实施方案中的任何一个，配子细胞是人或非人哺乳动物的配子细胞。根据一些实施方案，非人哺乳动物选自由家畜动物、家养宠物、啮齿类动物、野生动物和灵长类动物组成的组。在一个实施方案中，家畜动物选自牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛和骆驼。在一些其他实施方案中，家养宠物是猫或狗，啮齿类动物是大鼠、小鼠、豚鼠或仓鼠，兔形目动物是兔，且灵长类动物是猴例如猕猴或猿例如黑猩猩。

[0060] 根据另一个实施方案，配子细胞是非哺乳动物的配子细胞。根据一些实施方案，非哺乳动物选自由鱼、昆虫和鸟组成的组。

[0061] 根据一个实施方案，配子细胞是人精子细胞或卵母细胞。

[0062] 根据一些实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进卵母细胞或精子的成熟。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够改善精子质量。术语“促进精子成熟”和“改善精子质量”在本文中可互换使用，是指改进精子质量，例如促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。因此，在一个实施方案中，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。如本文所用的术语“精子运动性”是指在给定样本样品的所有精子中移动的精子比例。如本文所用的术语“前向运动性”是指在大致恒定的方向上移动的精子比例。如本文所用的术语“促进精子运动性”和“促进精子前向运动性”分别是指增加运动的精子和具有前向运动性的精子的比例。因此，在一个实施方案中，本发明提供了用于促进精子运动性的方法。根据另一方面，本发明提供了用于促进精子前向运动性的方法。精子运动性、前向运动性和精子成熟阶段可以通过本领域中任何已知的方法来评估。例如，运动性可以通过计算机辅助精子分析(CASA)方法(Amann&Waberski，2014年，Theriogenology，81:5-17)来评估。术语“精子样品”是指包含精子的一种或更多种样品。精子样品可以是从受试者获得的精液或处理过的精液、液化的精液、沉淀的和任选地再悬浮的精子等。根据一些实施方案，增加精子计数包括增加在运动性或前向运动性程序中的精子计数。根据一个实施方案，运动性或前向运动性程序是上游程序。

[0063] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于器官组织或器官的生长。根据一些实施方案，器官组织或器官选自卵巢、角膜、心脏、肾、胰腺、肝、脾、肺、睾丸、膀胱和血泡(blood vesicle)。在一个特定的实施方案中，器官组织或器官是卵巢。因此，本发明的细胞

培养基能够促进保存或维持器官组织或器官。

[0064] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于植物细胞的生长。根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于植物细胞培养物的生长。根据另一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于植物组织培养物的生长。术语“植物细胞培养物”是指来源于植物组织或细胞的植物细胞，然后在容器或受体(recipient)中培养。术语“植物组织培养物”包括愈伤组织(callustissue)(愈伤组织(callus))、分化培养的组织或培养的器官组织。术语“愈伤组织(callus)”是指来源于植物组织(外植体)的大量无组织薄壁细胞(unorganized parenchymatic cell)。

[0065] 根据另一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于昆虫细胞的生长。根据一个实施方案，昆虫细胞是昆虫细胞培养物，例如昆虫细胞系。细胞类型如上文所述。在一个特定实施方案中，细胞系选自Sf9、Sf21和high-five细胞系。根据另一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于昆虫组织培养物的生长。根据另外的实施方案，昆虫细胞是昆虫器官培养物。

[0066] 根据一些实施方案，细胞培养物是悬浮或贴壁细胞培养物。

[0067] 在一个实施方案中，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进植物细胞或组织培养物的生长，或者能够促进昆虫细胞、组织或器官培养物的生长。

[0068] 根据上述实施方案中的任何一个，本发明的细胞培养基，适合于动物、植物或昆虫细胞、组织或器官培养物的生长，可以是天然培养基或人工培养基，补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC，如本发明中所定义的。根据一些实施方案，培养基是补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的天然培养基。根据一些实施方案，天然培养基包含选自血浆、血清、淋巴、人胎盘脐带血清和羊水的生物流体。根据另一个实施方案，天然培养基包含组织提取物，例如肝、脾、肿瘤、白细胞和骨髓的提取物，牛胚胎和鸡胚胎的提取物。根据另外的实施方案，天然培养基包含凝结剂或血浆凝块。根据一些实施方案，培养基是补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的人工培养基。根据一个实施方案，人工培养基是平衡的盐溶液。平衡的盐溶液的实例是PBS、DPBS、HBSS、EBSS Tyrode的T6、WM1、Pool的P1、Quinn的HTF和Gardner的G1。根据另一个实施方案，人工培养基是基础培养基。根据一些实施方案，如本领域公知的，可以进一步补充培养基。根据一个实施方案，培养基补充有血清，例如胎牛血清。根据另外的实施方案，人工培养基是复合培养基。

[0069] 如本文所用的术语“基础培养基”，是指无机盐、糖、氨基酸的营养混合物，任选地还含有维生素、有机酸和/或缓冲剂。基础培养基和补充剂一起提供支持细胞生命、生长和繁殖所必需的营养。使用的基础培养基的选择应适应于培养物。

[0070] 根据一个实施方案，人工培养基是无血清培养基。根据另外的实施方案，人工培养基是具有降低的血清含量的培养基。根据另一个实施方案，人工培养基是无蛋白培养基。

[0071] 可用由至少一种稳定剂稳定的ACC补充的并根据本发明使用的细胞培养基的实例是Dulbecco氏改良的Eagle培养基(DMEM)、最少必需培养基(EMEM)、RPMI 1640培养基(在Roswell Park Memorial Institute开发)和Eagle基础培养基(BME)。根据本发明的培养基的另外实例是Ham氏营养混合物，例如Ham氏F-10、Ham氏F-12、DMEM/F-12(DMEM和Ham氏F-12)。其他实例是Iscove的改良的Dulbecco氏培养基(IMDM)、opti-MEM和Glasgow的MEM(GMEM)。适合于昆虫细胞生长的培养基的实例是IPL-41昆虫培养基、Schneider果蝇培养

基、Grace昆虫培养基、无血清昆虫培养基、Sf-900、TC-10、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基和IPL-10。适合于胚胎生长的培养基的实例是单培养物培养基例如SAGE 1-Step™或连续培养基例如Quinns Advantage™连续培养基(ORIGIO)。适合于植物细胞生长的培养基的实例是Murashige和Skoog(MS)、B5、N6和Nitsch培养基。

[0072] 培养基的其他实例是改良培养基(Modified Medium)、NCTC培养基、MegaCell培养基、Claycomb、Click培养基、L-15培养基、培养基199、MCDB培养基、Ames培养基、BGJb培养基(Fitton-Jackson改良)、Click培养基、CMRL-1066培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、Swim的S-77培养基、Waymouth培养基、Willliam培养基E和体外受精培养基，例如global®、GM501、SSM™、卵裂K-SICM、胚泡K-SIBM、Quinns Advantage®卵裂、Quinns Advantage®胚泡、FERTICULT™IVF培养基、FERTICULT™ G3培养基、IVC-TWO™、IVC-THREE™、ECM®、MultiBlast®、EmbryoAssist™、BlastAssist™、ISM1、ISM2、G-1™PLUS、G-2™PLUS、IVF™和CCM™。培养基的另外实例是用于精子分离的培养基，例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)；用于精子洗涤的培养基，例如Quinns™精子洗涤培养基、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)或改良的具有庆大霉素的HTF培养基；用于精子获能的培养基，例如Biggers-Whitten-Whittingham(BWW)培养基、Ham氏-F10和改良的Tyrode培养基(HSM)；以及用于成熟的培养基，其使得未成熟卵母细胞能够培养成完全发育的适合于转移的胚胎。在其他实施方案中，培养基是用于卵母细胞成熟的培养基，例如SAGETM体外成熟培养基(IVM)和BO-IVM卵母细胞成熟培养基、用于受精的培养基、用于胚胎发育的培养基、用于配子处理的培养基、用于植入前遗传诊断(PGD)的培养基或用于胚胎或/和配子成熟、处理和/或冷冻保存的培养基。因此，根据一个实施方案，细胞培养基选自DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、L-15培养基(Leibovitz)、MCDB培养基、培养基199、opti-MEM和DMEM/F-12、Schneider的果蝇培养基、Grace的昆虫培养基、IPL-41昆虫培养基Sf-900、无血清昆虫培养基、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基、Ham氏F-12、Ham氏F-10、GMEM、Ames培养基、Eagle基本培养基(BME)、Claycomb、Click培养基、Glasgow最少必需培养基(GMEM)、MegaCell培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、Williams培养基E、Waymouth培养基、TC-10和IPL-10培养基。根据另一个实施方案，细胞培养基选自DMEM、RPMI1640、MEM、IMDM、opti-MEM、GMEM、Ham氏F-12和DMEM/F-12、Schneider的果蝇培养基、Grace的昆虫培养基、Sf-900、TC-10、IPL-10培养基、用于精子分离、洗涤或成熟的培养基，例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基、Biggers-Whitten-Whittingham(BWW)培养基、Ham氏-F10和改良的Tyrode培养基(HSM)和改良的具有庆大霉素的HTF培养基、用于受精的培养基、用于胚胎发育的培养基以及用于胚胎或/和配子成熟、处理和/或冷冻保存的培养基。

[0073] 根据一些实施方案，由本发明的稳定的ACC补充的细胞培养基适合于单细胞真核生物的生长。根据一个实施方案，单细胞真核生物是酵母(yeast)，例如酵母菌(Saccharomyce)，更特定地是酿酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)。根据一个实施方

案，本发明的适合于单细胞真核生物(例如酿酒酵母菌)生长的细胞培养基，选自酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YPD)、酵母提取物蛋白胨甘油(YPG)和酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YPAD)培养基。在一个实施方案中，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进酵母的生长。

[0074] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于原核生物的生长。在特定的实施方案中，本发明的细胞培养基适合于微生物生长。在一些实施方案中，微生物是微生物群微生物(microbiome microorganisms)。在一些实施方案中，微生物是细菌。因此，在特定的实施方案中，本发明的细胞培养基适合于细菌生长。在一些实施方案中，细菌是大肠杆菌或益生菌，例如双歧杆菌属和乳酸杆菌属的细菌。益生菌种类菌株的其他实例是副干酪乳杆菌(Lactobacillus Paracasei)、长双歧杆菌(Bifidobacterium Longum)、约翰尼斯乳杆菌(Lactobacillus Johnsonii)、发酵乳杆菌(Lactobacillus Fermentum)、乳酸片球菌(Pediococcus Acidlacti)，例如：嗜酸乳杆菌(Lactobacillus Acidophilus)、鼠李糖乳杆菌GG(Lactobacillus Rhamnosus GG)、瑞士乳杆菌(Lactobacillus Helveticus)、婴儿双歧杆菌(Bifidobacterium Infantis)、乳酸双歧杆菌(Bifidobacterium Lactis)、保加利亚乳杆菌(Lactobacillus Bulgaricus)、唾液乳杆菌(Lactobacillus Silivarius)、植物乳杆菌(Lactobacillus Plantarum)、罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus Reuteri)、干酪乳杆菌(Lactobacillus Casei)、双歧双歧杆菌(Bifidobacterum Bifidum)、布拉酵母菌(Saccharomyces Boulardii)、嗜热链球菌(Streptococcus Thermophilus)、短双歧杆菌(Bifidobacterum Breve)、凝结芽孢杆菌(Bacillus Coagulans)和短乳杆菌(Lactobacillus Brevis)。根据一些实施方案，适合于细菌生长的培养基选自LB和M9。在一个实施方案中，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进细菌的生长。

[0075] 根据一些实施方案，本发明的细胞培养基适合于古细菌的生长。在一个实施方案中，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够促进古细菌的生长。

[0076] 根据本发明的任一方面和任何一个实施方案，ACC由至少一种稳定剂稳定。术语“稳定剂(stabilizing agent)”和“稳定剂(stabilizer)”在本文中可互换使用，并是指在ACC生产、配制储存和/或使用期间有助于将碳酸钙保持在无定形状态的任何物质。在某些实施方案中，稳定剂是单一剂。在其他实施方案中，涵盖了几种稳定剂的使用。术语“稳定的ACC”和“由至少一种稳定剂稳定的ACC”可以在一些实施方案中互换使用。

[0077] 稳定剂可以包含具有一个或更多个选自但不限于羟基、羧基、酯、胺基、膦基、膦酰基、磷酸基、磺酰基、硫酸基或亚磺基基团的官能团基团的分子。含羟基化合物与氢氧化物组合，任选地还含有其他官能团，如羧基等，但是羟基没有被酯化。

[0078] 根据一些实施方案，稳定剂对哺乳动物细胞或生物体，特别是对人具有低毒性或无毒性。根据一些实施方案，稳定剂是食品、保健品或药物级的。

[0079] 在某些实施方案中，ACC稳定剂每次出现时独立地是有机酸；磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物；羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯；有机胺化合物；包含羟基的有机化合物；有机磷化合物或其盐；磷酸化的氨基酸及其衍生物；二膦酸盐；有机磷酸盐化合物；有机膦酸盐化合物；有机聚磷酸盐、无机聚磷酸盐、无机亚磷酸、具有如上定义的多个官能团的有机化合物；无机磷酸盐和聚磷酸盐化合物；具有聚磷酸链的有机化合物；有机表面活性剂；生物必需的无机离子；糖类及其衍生物、蛋白、磷酸化的蛋白、天然和合成的生物聚合物及其衍生物或它们的任意组合。根据一些实施方案，稳定剂也可以具有药物活性，例如双膦

酸或ATP。

[0080] 因此，在一个实施方案中，稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐，例如无机聚磷酸盐、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、磷酸化的氨基酸、二膦酸盐、有机聚磷酸盐、糖类及其衍生物、蛋白、肽、磷酸化的蛋白、磷酸化的肽以及它们的任意组合。根据另一个实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：磷酸丝氨酸、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、植酸、柠檬酸、依替膦酸、焦磷酸盐、聚磷酸盐、三磷酸盐、乙醇、六偏磷酸盐、几丁质以及它们的任意组合。

[0081] 根据一些实施方案，稳定剂是有机酸。根据某些实施方案，有机酸选自抗坏血酸、柠檬酸、乳酸或乙酸、草酸、丙二酸、戊二酸、琥珀酸、马来酸、乳酸、谷氨酸、乌头酸，并且任选地包括具有至少两个羧基基团的任选地分子量不大于250g/mol的化合物，例如柠檬酸、酒石酸、苹果酸等。根据一个特定的实施方案，稳定剂是柠檬酸。

[0082] 在另一个实施方案中，羟基羧酸的磷酸酯是磷酸烯醇丙酮酸。在另一个实施方案中，羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯包含氨基酸。这样的酯的实例是磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、硫酸丝氨酸、硫酸苏氨酸和磷酸肌酸。

[0083] 在另一个实施方案中，稳定剂是糖类。根据一个实施方案，糖类选自单糖、二糖、三糖、寡糖和多糖，如蔗糖、甘露糖、葡萄糖、壳聚糖和几丁质。稳定剂在一些实施方案中可以是多元醇如甘油。根据另一个实施方案，稳定剂是氨基酸如丝氨酸或苏氨酸。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0084] 天然和合成生物聚合物和衍生物的非限制性实例是多核苷酸和糖蛋白。

[0085] 在天然食品或人类中发现的被批准用于食品消费品的这样的ACC稳定剂的一些具体的无限制性的实例包括植酸、柠檬酸、焦磷酸氢二钠、腺苷5′-单磷酸(AMP)钠盐、腺苷5′-二磷酸(ADP)钠盐和腺苷5′-三磷酸(ATP)二钠盐水合物、磷酸丝氨酸、磷酸化的氨基酸、食品级表面活性剂、硬脂酰乳酸钠以及它们的组合。

[0086] 根据一些实施方案，稳定剂包含选自以下的至少一种组分：羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯，如磷酸烯醇丙酮酸、磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸、磺基丝氨酸(sulfoserine)或磺基苏氨酸，和糖类，选自单糖、二糖、三糖、寡糖和多糖，例如蔗糖、甘露糖、葡萄糖。含羟基有机化合物还可以包括至少一种碱金属氢氧化物，如氢氧化钠、氢氧化钾等等。磷酸化的酸可以以寡肽和多肽存在。在本发明的其他实施方案中，稳定剂是选自单羧酸或多羧酸的有机酸，例如二羧酸或三羧酸。每种可能性代表本发明的单独的实施方案。有机酸可如上文定义。

[0087] 在本发明的一些实施方案中，ACC稳定剂选自磷酸化的氨基酸、多元醇以及它们的组合。在一些实施方案中，稳定ACC包含磷酸化的化合物作为稳定剂，其中磷酸化对有机化合物的羟基进行。在一些实施方案中，稳定ACC包含选自由以下组成的组的稳定剂：柠檬酸、磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸以及它们的组合。包含磷酸根、亚磷酸根、膦酸根基团及其盐或酯的稳定剂的非限制性实例包括植酸、磷酸二甲酯、磷酸三甲酯、焦磷酸钠、焦磷酸四乙酯、二磷酸核酮糖、依替膦酸和其他药用双膦酸、3-磷酸甘油酸盐、3-磷酸甘油醛、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸钠盐、二乙烯三胺五(甲基膦酸)、腈三(甲基膦酸)、5-磷酸-D-核糖1-二磷酸五钠盐，腺苷5'-二磷酸钠盐、腺苷5'-三磷酸二钠盐水合物、α-D-半乳糖胺1-磷酸、2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐、α-D-半乳糖1-磷酸二钾盐五水合物、α-D-半乳糖胺1-磷酸、O-磷酸乙醇胺二钠盐水合物、2,3-二磷酸-D-甘油酸五钠盐、磷酸(烯醇)丙酮酸单钠盐水合物、D-甘油醛3-

磷酸盐、sn-甘油3-磷酸锂盐、D-(-)-3-磷酸甘油酸二钠盐、D-葡萄糖-6-磷酸钠盐、磷脂酸、伊班膦酸钠盐、膦酰基乙酸，DL-2-氨基-3-膦酰基丙酸或它们的组合。生物必需无机离子可以包括，除其他外，Na、K、Mg、Zn、Fe、P、S、N；以氧化物相的P或S；或作为氨或硝基基团的N。

[0088] 稳定剂可以还包括膦酸盐化合物，例如但不限于二膦酸盐、聚磷酸盐，例如但不限于焦磷酸盐或聚膦酸盐或有机聚磷酸盐，例如但不限于二磷酸腺苷(ADP)或三磷酸腺苷(ATP)。

[0089] 任选地，ACC由磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合稳定。在另一个实施方案中，ACC由三磷酸和柠檬酸稳定。

[0090] ACC可以由多于一种稳定剂，例如两种稳定剂稳定。稳定的ACC可以包括两种以上的稳定剂，其中在ACC的形成和沉淀过程中向ACC中添加一种或更多种稳定剂；从而构成“内部”稳定剂，并且在ACC形成后向ACC颗粒表面添加另外一种或更多种稳定剂；因此，构成“外部”稳定剂。稳定ACC及其制备的另外实例可以在国际专利申请WO 2009/053967、WO 2014/024191和WO 2016/193982中找到。

[0091] 在一些实施方案中，稳定剂是蛋白。在一个实施方案中，蛋白是天然产生和纯化的蛋白。在另一个实施方案中，蛋白是合成产生的蛋白。在一些实施方案中，蛋白选自GAP65、GAP22、GAP21和GAP12蛋白。在另一个实施方案中，蛋白选自CqCDA1、几丁质酶2、β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶、GAMP样、几丁质结合蛋白、CqCBP、CAP10、GAP 18.2、GAP 02526、CqHc1、CqHc2、CqHc3、CqHc4、CqHc5、CqHc6、CqHc7、隐花青素1(cryptocyanin1)、亲环素(cyclophilin)、胱抑素1(cystatin 1)、胱抑素2(cycstatin 2)、LPS-BP、LEA蛋白和结晶花青素(crystacyanin)，任选地所述蛋白质来自红鳌螯虾(C.quadricarinatus)。根据某些实施方案，蛋白是磷酸化的蛋白。

[0092] 在一些实施方案中，稳定剂选自：聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、二膦酸盐、糖类、其衍生物、蛋白、磷酸化的蛋白、天然和合成的生物聚合物及其衍生物、以及它们的任意组合。在其他实施方案中，稳定剂选自磷酸丝氨酸、三磷酸盐、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、植酸、柠檬酸、依替膦酸、焦磷酸盐、乙醇、六偏磷酸盐、几丁质以及它们的任意组合。

[0093] 在一些实施方案中，稳定剂选自有机酸、磷酸化的有机酸、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、磷酸化的氨基酸、二膦酸盐、有机聚磷酸盐、糖类、其衍生物、蛋白以及它们的任意组合。

[0094] 根据一些实施方案，所述至少一种稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐、二膦酸盐、磷酸化的氨基酸、柠檬酸以及它们的任意组合。在一些实施方案中，添加了多于一种稳定剂，例如2、3或4种稳定剂。

[0095] 根据一些实施方案，稳定剂是聚磷酸或其药学上可接受的盐。根据一些实施方案，聚磷酸盐是生理相容的水溶性聚磷酸盐，其选自由钠、钾和聚磷酸盐的任何其他必需的阳离子组成的组。在一个实施方案中，聚磷酸盐是有机或无机聚磷酸盐。如本文所用的术语“聚磷酸盐”是指PO_4的聚合酯。根据一些实施方案，聚磷酸盐是生理上相容的水溶性聚磷酸盐，其选自由聚磷酸钠和聚磷酸钾组成的组。在一些实施方案中，聚磷酸/聚磷酸盐是无机聚磷酸或其药学上可接受的盐。这样的盐的非限制性实例是Na、K、Mg、Mn和Zn。根据一些实施方案，无机磷酸盐包含2至10个磷酸基团，例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个磷酸基团。根据一

些实施方案，聚磷酸盐选自焦磷酸盐、三磷酸盐和六偏磷酸盐。根据一个实施方案，稳定剂是焦磷酸或其药学上可接受的盐，例如焦磷酸钠。根据另一个实施方案，稳定剂是三磷酸或其药学上可接受的盐，例如三磷酸钠。术语“三磷酸/三磷酸盐”和“三聚磷酸/三聚磷酸盐”在本文中可互换使用。根据另外的实施方案，稳定剂是六偏磷酸或其药学上可接受的盐，例如六偏磷酸钠。

[0096] 根据一些实施方案，稳定剂是二膦酸或其药学上可接受的盐。盐的非限制性实例是Na、K、Mg、Mn和Zn。

[0097] 如本文所用的术语“二膦酸/二膦酸盐”是指具有两个膦酸根($PO(OH)_2$)基团的有机化合物。该术语还涉及具有PO3-有机-PO3骨架的化合物。最典型的是用于作为用于治疗骨质疏松症的药物的一系列双膦酸。根据一些实施方案，二膦酸/二膦酸盐选自由依替膦酸、唑来膦酸、亚甲膦酸(medronic acid)、阿仑膦酸(alendronic acid)及其药学上可接受的盐组成的组。根据一些实施方案，稳定剂是依替膦酸或其药学上可接受的盐。根据另一个实施方案，稳定剂是唑来膦酸或其药学上可接受的盐。根据另外的实施方案，稳定剂是亚甲膦酸或其药学上可接受的盐。根据某些实施方案，稳定剂是阿仑膦酸或其药学上可接受的盐。

[0098] 根据某些实施方案，稳定剂是磷酸化的氨基酸。根据一个实施方案，磷酸化的氨基酸是磷酸丝氨酸。根据另一个实施方案，磷酸化的氨基酸是磷酸苏氨酸。

[0099] 根据一些实施方案，ACC组合物包含上文公开的稳定剂的组合。

[0100] 根据一些实施方案，稳定剂是如上文定义的聚磷酸盐或二磷酸盐，且稳定剂的P原子与ACC的Ca原子之间的摩尔比率(P:Ca摩尔比率)为约1:90至1:1。在一个实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:40至约1:1。在另外的实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:35至约1:2。在某些实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:30至约1:3。在某些实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:28至约1:3。在其他实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:25至约1:4。在另外的实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:20至约1:5。在另一个实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:20至约1:6。在特定的实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:15至约1:5。在另一个特定的实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:25至约1:5。根据一些实施方案，这样的聚磷酸/聚磷酸盐是焦磷酸、三磷酸、六偏磷酸或其药学上可接受的盐。根据另一个实施方案，二膦酸/二膦酸盐是阿仑膦酸、依替膦酸、唑来膦酸或亚甲膦酸，并且P:Ca摩尔比率如上文所定义。

[0101] 根据一些实施方案，包含聚磷酸盐或二膦酸盐的稳定的ACC的钙含量(Ca含量)为约1wt％至约39wt％、约5wt％至约39wt％、约10wt％至约39wt％、约15wt％至约39wt％、约20wt％至约38wt％、约25wt％至约38wt％、或约30wt％至约38wt％。术语“Ca含量”和“钙含量”在本文中可互换使用，是指最终组合物中ACC的钙含量。

[0102] 在某些实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:40至约1:1，并且Ca含量为约20wt％至约39wt％。在一些实施方案中，P:Ca摩尔比率为约1:28至约1:3，并且Ca含量为约30wt％至约38wt％。在另一个实施方案中，摩尔比率为1:25至约1:5，并且Ca含量为约30wt％至约36wt％。

[0103] 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、双膦酸盐、柠檬酸、酒石酸以及它们的任意组合。根据一个实施方案，聚磷酸盐选自由三磷酸盐、焦磷酸盐和六偏磷酸盐组成的组，磷酸化的氨基酸是磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸，并且二

膦酸/二膦酸盐选自由阿仑膦酸盐、依替膦酸、唑来膦酸和亚甲膦酸组成的组。

[0104] 根据一些实施方案，稳定的ACC包含少于20wt％、少于15wt％、少于10wt％或少于5wt％的稳定剂。在一些实施方案中，稳定的ACC包含多达5wt％的稳定剂。

[0105] 根据一个实施方案，稳定的ACC的一次颗粒的平均直径为约10nm至约5μm。根据另一个实施方案，ACC的一次颗粒的平均直径为约30nm至约400nm。根据又另一个实施方案，ACC的一次颗粒的平均直径为约30nm至350nm。根据某些实施方案，ACC的一次颗粒的平均直径为约35nm至300nm、40nm至约250nm、约45nm至约200nm、约50nm至约150nm或约60nm至约100nm。根据仍另一个实施方案，ACC的一次颗粒是聚集的，并且聚集体的平均直径在0.5μm和300μm之间。根据一个另外的实施方案，ACC的一次颗粒的聚集体的直径为约1至约100μm、约10至约50μm或约20至约40μm。根据另一个实施方案，ACC的一次颗粒的聚集体的平均直径在1μm和10μm之间。

[0106] 根据上述实施方案中的任何一个，在细胞培养基中稳定的ACC的最终浓度为约0.1至约20mM、约0.5至约15mM、约1至约10mM、约2至约8mM、约3mM至约6mM或约4mM至约5mM。在更特定的实施方案中，稳定的ACC以0.5至约4mM、约1至约3mM、约1.5至约2.5或约1、1.5、2或2.5mM的浓度存在。根据一些实施方案，在细胞培养基中稳定的ACC的浓度为约0.0001％w/v至约1％w/v、约0.0005％w/v至约0.5％w/v、约0.001％w/v至约0.1％w/v、约0.005％w/v至约0.05％w/v、约0.01％w/v至约0.03％w/v。

[0107] 根据一些更具体的实施方案，本发明提供了补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基，其中稳定剂选自聚磷酸盐，例如无机聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、二膦酸盐、有机酸以及它们的任意组合；并且细胞培养基适合于(i)肌肉、神经或骨细胞或组织培养物；(ii)人或非人哺乳动物胚胎；(iii)干细胞；(iv)配子细胞或(v)卵巢的生长。根据一些实施方案，稳定剂是磷酸丝氨酸。根据另一个实施方案，稳定剂是三磷酸盐。根据又另一个实施方案，稳定剂是磷酸丝氨酸与有机酸例如柠檬酸的组合。根据另外的实施方案，稳定剂是三磷酸盐例如三磷酸钠与有机酸例如柠檬酸的组合。根据一个实施方案，这样的细胞培养基适合于肌肉、神经或骨细胞或组织培养物的生长。根据更特定的实施方案，细胞培养基能够支持和促进细胞的生长，例如增殖、成熟、发育或分化。根据一个实施方案，细胞是神经细胞，并且更特定地是受损的神经细胞。因此，根据一个实施方案，这样的细胞培养基能够促进受损神经细胞的再生。根据另一个实施方案，细胞是肌细胞，特别是营养不良的肌细胞，例如杜氏肌营养不良的细胞。因此，根据一个实施方案，细胞培养基能够促进肌管的形成和/或收缩性的开始。根据另一个实施方案，这样的细胞培养基适合人或非人哺乳动物胚胎的生长。在一个特定的实施方案中，细胞培养基适合于人胚胎的生长。在甚至更特定的实施方案中，细胞培养基能够促进人胚胎的发育。根据另一个实施方案，这样的细胞培养基适合于人或非人哺乳动物配子细胞的生长。在一个特定的实施方案中，细胞培养基适合于人配子细胞的成熟。在甚至更特定的实施方案中，细胞培养基能够促进人配子细胞的成熟。根据另一个实施方案，细胞培养基能够使人精子成熟，例如促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。根据另外的实施方案，这样的细胞培养基培养物适合于干细胞，特别是人干细胞的生长。根据一些实施方案，干细胞选自胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞。根据一个实施方案，这样的细胞培养基适合于干细胞的增殖和/或分

化。根据一个特定的实施方案，这样的细胞培养基能够促进干细胞例如MBA13向成骨细胞的分化。根据一些实施方案，稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数，例如细胞的增殖、成熟、发育或分化提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。根据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0108] 根据一些实施方案，本发明提供了补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基，例如卵裂、单培养物或连续培养基，其中所述剂是磷酸丝氨酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM，并且细胞培养基能够促进人胚胎的生长，例如发育。

[0109] 根据一些实施方案，本发明提供了补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基，例如用于精子分离、洗涤或成熟的培养基，例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基和改良的具有庆大霉素的HTF培养基，其中所述剂是磷酸丝氨酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM，并且细胞培养基能够促进精子细胞的成熟，例如促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。

[0110] 根据其他实施方案，本发明提供了补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基，其中所述剂是磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，并且所述细胞培养基能够促进神经细胞的再生。

[0111] 根据其他实施方案，本发明提供了细胞培养基，例如DMEM/F12或任选地补充有马血清(HS)、L-谷氨酰胺、庆大霉素和胰岛素的DMEM/F12，其中所述培养基还补充有由磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合稳定的ACC，其中稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM，并且所述细胞培养基能够促进骨骼肌细胞中肌管的形成和/或收缩性的开始，例如在杜氏肌营养不良症的情况下。

[0112] 根据其他实施方案，本发明提供了补充有由磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合稳定的ACC的细胞培养基，并且所述细胞培养基能够促进干细胞的分化，特别是MBA13向成骨细胞的分化，其中稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM。

[0113] 根据其他实施方案，本发明提供了细胞培养基，例如DMEM/F12或具有10％胎牛血清(FBS)、2mM谷氨酰胺、25μg/mL庆大霉素和0.3-0.5％NVR-Gel的DMEM/F12，其中所述培养基还补充有由磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合稳定的ACC，其中稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM，并且所述细胞培养基能够促进卵巢的保存。

[0114] 根据另一方面，本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)，用于作为细胞培养基的补充剂使用。术语“补充剂”和“细胞培养基补充剂”在本文中可互换使用，是指用于添加到细胞培养基中的一种或多种组分。在一个特定的实施方案中，该术语是

指添加到或意图添加到细胞培养基中的稳定的ACC。根据一个实施方案，稳定的ACC在培养基制备期间被添加到培养基中。根据另一个实施方案，在使用前将ACC添加到培养基中。

[0115] 根据一个实施方案，稳定的ACC用于作为适合于生长生物培养物的细胞培养基的补充剂使用。

[0116] 根据一些实施方案，当添加到细胞培养基中时，本发明的稳定的ACC促进细胞的生长。因此，在一个实施方案中，用于作为细胞培养基补充剂使用的稳定的ACC能够促进细胞的生长。在一个实施方案中，用于作为细胞培养基补充剂使用的稳定的ACC促进细胞、组织和器官的增殖、成熟、繁殖、再生、发育和/或分化。根据一个实施方案，用于作为细胞培养基补充剂使用的本发明的ACC能够促进干细胞的分化。根据另一个实施方案，用于作为细胞培养基补充剂使用的这样的ACC能够促进细胞的增殖。根据又另一个实施方案，用于作为细胞培养基补充剂使用的ACC能够促进成熟，例如配子的成熟，或促进细胞的发育，例如胚胎的发育。根据某些实施方案，用于作为细胞培养基补充剂使用的ACC能够促进细胞的再生。

[0117] 根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数，例如细胞的增殖、成熟、发育或分化提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。根据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0118] 根据一些实施方案，细胞培养基补充剂可以被添加到任何已知的细胞培养基中。根据某些实施方案，培养基如上文所定义。根据一个实施方案，细胞培养基选自天然培养基和人工培养基。根据一个实施方案，培养基适合于任何生物培养物的生长，所述生物培养物例如细胞培养物、组织培养物、器官培养物、单细胞真核生物或微生物例如细菌。根据一个实施方案，细胞培养基适合于培养物的生长，所述培养物选自动物、植物或昆虫细胞、组织和/或器官的培养物。根据另一个实施方案，细胞培养基适合于细菌或酵母的生长。

[0119] 根据一些实施方案，动物细胞的培养物选自人或非人哺乳动物的细胞培养物、组织培养物、器官培养物、干细胞、配子、胚胎和器官。根据其他实施方案，哺乳动物是非人哺乳动物，例如家畜动物，例如牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛或骆驼；家养宠物，例如猫或狗；啮齿类动物，例如小鼠、大鼠、豚鼠或仓鼠；兔形目动物，例如兔；或者灵长类动物，例如猴(例如猕猴)或猿(例如黑猩猩)。根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于原代或传代培养物生长的细胞培养基的补充剂使用。根据一些实施方案，稳定的ACC能够促进所述细胞系的生长。根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于哺乳动物组织培养物生长的细胞培养基的补充剂使用。根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于干细胞生长的细胞培养基的补充剂使用。根据另一个实施方案，干细胞是人或非人哺乳动物干细胞。

[0120] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于胚胎生长的细胞培养基的补充剂使用。根据一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于胚胎的成熟和发育。根据另一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进胚胎的发育。根据一个实施方案，胚胎是人胚胎。根据另一个实施方案，胚胎是非人哺乳动物胚胎。

[0121] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于配子生长的细胞培养基的补充剂使用。根据一个实施方案，本发明的细胞培养基适合于配子的成熟或保存。根据另一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进配子的成熟或保存，例如精子或卵母细胞的成熟或保存。

[0122] 根据另一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进胚胎或配子的冷冻保存，如上文所描述。

[0123] 根据一些实施方案，促进精子的成熟选自促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。根据一个实施方案，精子是人精子。根据另一个实施方案，精子是非人哺乳动物精子。根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于器官培养物或器官生长的细胞培养基的补充剂使用。根据一些实施方案，器官组织或器官选自卵巢、角膜、心脏、肾、胰腺、肝、脾、肺、睾丸、膀胱和血泡。在一个特定的实施方案中，器官组织或器官是卵巢。

[0124] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于植物或昆虫细胞生长的细胞培养基的补充剂使用。

[0125] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于动物、植物或昆虫细胞生长的细胞培养基的补充剂使用，所述细胞培养基是选自生物流体、组织提取物和凝块的天然培养基；或者选自平衡的盐溶液、基础培养基和复合培养基的人工培养基。

[0126] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为细胞培养基的补充剂使用，所述细胞培养基选自DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、L-15培养基(Leibovitz)、MCDB培养基、培养基199、opti-MEM和DMEM/F-12、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、IPL-41昆虫培养基Sf-900、无血清昆虫培养基、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基、Ham氏F-12、Ham氏F-10、GMEM、Ames培养基、Eagle基本培养基(BME)、Claycomb、Click培养基、Glasgow最少必需培养基(GMEM)、MegaCell培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、Williams培养基E、Waymouth培养基、TC-10和IPL-10培养基。根据一个实施方案，稳定的ACC用于作为细胞培养基的补充剂使用，所述细胞培养基选自单培养物培养基，例如Quinn's Advantage™(SAGE)培养基1-Step™、连续培养基，例如Quinn's Advantage™、连续培养基(ORIGIO)、MEDICULT、通用IVM、DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、opti-MEM、GMEM、Ham氏F-12、DMEM/F-12、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、Sf-900、TC-10、IPL-10、B5、N6和Nitsch培养基。根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为细胞培养基的补充剂使用，所述细胞培养基选自用于精子的培养基、用于精子或成熟的培养基，例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基和改良的具有庆大霉素的HTF培养基；用于受精的培养基；用于胚胎发育的培养基以及用于胚胎或/和配子成熟、处理和/或冷冻保存的培养基。

[0127] 根据这些实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂的ACC在添加到细胞培养基中时能够促进细胞培养物、组织培养物或器官培养物的生长。

[0128] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于单细胞真核生物生长的细胞培养基的补充剂使用。根据一个实施方案，单细胞真核生物是酵母例如酵母菌，更特定地是酿酒酵母菌。根据一个实施方案，稳定的ACC用于作为YPD、YPG或YPAD培养基的补充剂使用。

[0129] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于原核生物例如细菌生长的细胞培养基的补充剂使用。在一些实施方案中，细菌是大肠杆菌或益生菌，例如双歧杆菌属和乳酸杆菌属的细菌。根据一个实施方案，稳定的ACC用于作为LB和M9培养基的补充剂使用。

[0130] 根据这些实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的ACC在添加到细胞培养基中时能够促进所述酵母或所述细菌的生长。

[0131] 根据一些实施方案，稳定的ACC用于作为适合于古细菌生长的细胞培养基的补充剂使用。

[0132] 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐例如三磷酸盐、磷酸化的氨基酸例如磷酸丝氨酸、二磷酸盐、柠檬酸以及它们的任意组合例如三磷酸盐和柠檬酸的组合或磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合。

[0133] 根据一些实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC在干燥形式以无定形相保持稳定持续至少7天、至少1个月、至少3个月、至少6个月或至少1年的时间。在其他实施方案中，当分散在细胞培养基中持续至少1小时、持续至少4、6、8、12或24小时、至少7天或至少1个月的时间时，稳定的ACC以无定形相保持稳定。

[0134] 根据上述实施方案中的任何一个，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC可以被配制成固体、液体或半液体形式。根据一些实施方案，用于本发明使用的稳定的ACC被配制成固体形式，例如粉末、片剂、胶囊或颗粒。在一个特定的实施方案中，用于作为补充剂使用的稳定的ACC被配制成粉末。根据一些实施方案，用于作为补充剂使用的稳定的ACC被配制成液体或半液体形式。根据一个实施方案，液体形式是悬浮液或乳液，并且半液体形式是凝胶或粘性悬浮液，例如胶体悬浮液。在一个具体实施方案中，稳定的ACC被配制成悬浮液。因此，在一个实施方案中，在制备细胞培养基期间或在使用该培养基之前，将用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC以粉末或悬浮液添加到细胞培养基中。根据一个甚至更具体的实施方案，稳定的ACC作为新鲜制备的悬浮液添加。

[0135] 根据一个实施方案，稳定的ACC的一次颗粒的平均直径为约10nm至约5μm。根据另一个实施方案，ACC的一次颗粒的平均直径为约30nm至约400nm。根据又另一个实施方案，ACC的一次颗粒的平均直径为约30nm至350nm。

[0136] 根据某些实施方案，ACC的一次颗粒的平均直径为约35nm至300nm、40nm至约250nm、约45nm至约200nm、约50nm至约150nm或约60nm至约100nm。根据仍旧另一个实施方案，ACC的一次颗粒是聚集的，并且聚集体的平均直径在0.5μm和300μm之间。根据一个另外的实施方案，ACC的一次颗粒的聚集体的直径为约1至约100μm、约10至约50μm或约20至约40μm。根据另一个实施方案，ACC的一次颗粒的聚集体的平均直径在1μm和10μm之间。

[0137] 根据上述实施方案中的任何一个，用于作为细胞培养基的补充剂使用的ACC以约0.1至约20mM、约0.5至约15mM、约1至约10mM、约2至约8mM、约3mM至约6mM或约4mM至约5mM的最终浓度被添加到细胞培养基。在更特定的实施方案中，稳定的ACC以0.5至约4mM、约1至约3mM、约1.5至约2.5或约1、1.5、2或2.5mM的浓度存在。

[0138] 根据一些更具体的实施方案，本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的ACC，所述稳定剂选自聚磷酸盐，例如有机聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、二膦酸盐、有机酸以及它们的任意组合，以用于作为适合于(i)肌肉、神经或骨细胞或组织培养物；(ii)人或非人哺乳动物胚胎；(iii)干细胞；(iv)配子或(v)卵巢的生长的细胞培养基的补充剂。根据一些实施方案，稳定剂是磷酸丝氨酸。根据另一个实施方案，稳定剂是三磷酸盐。根据又另一个实施方案，稳定剂是磷酸丝氨酸与有机酸例如柠檬酸的组合。根据另外的实施方案，稳定剂是三磷酸盐例如三磷酸钠与有机酸例如柠檬酸的组合。根据一个实施方案，这样的细胞培养基适合于肌肉、神经或骨细胞或组织培养物的生长。根据一个实施方案，补充所述细胞培养基的稳定的ACC能够促进细胞的生长，例如增殖、发育、成熟或分化。根据一个实施方案，细胞是

神经细胞，并且更特定地是受损的神经细胞。根据一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进受损的神经细胞的再生。根据另一个实施方案，细胞是肌细胞，特别是营养不良的肌细胞，例如杜氏肌营养不良的细胞。根据一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进肌管形成和/或肌细胞收缩性的开始。根据一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进人胚胎的发育。根据一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进配子，并且特别是精子的成熟或保存。根据另一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进胚胎或配子的冷冻保存，如上文所描述。根据一个实施方案，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC能够促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。根据另外的实施方案，用于作为补充剂使用的稳定的ACC能够促进干细胞，并且特别是人干细胞的生长，例如增殖、扩增和/或分化。根据一些实施方案，干细胞选自胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数，例如细胞的增殖、成熟、发育或分化提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。根据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0139] 根据一些实施方案，本发明提供了稳定的ACC，其用于作为卵裂、单培养物或顺序培养基的补充剂使用，其中稳定剂是磷酸丝氨酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，并且所述稳定的ACC能够促进人胚胎的发育。

[0140] 根据一些实施方案，本发明提供了用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC，其中所述剂是磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，并且所述稳定的ACC能够促进神经细胞的再生。

[0141] 根据一些实施方案，本发明提供稳定的ACC，其用于作为DMEM/F12或任选地补充有马血清(HS)、L-谷氨酰胺、庆大霉素和胰岛素的DMEM/F12的补充剂，其中所述稳定剂选自磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，并且所述稳定的ACC能够促进骨骼肌细胞中肌管的形成和/或收缩性的开始，例如在杜氏肌营养不良症的情况下。

[0142] 根据一些实施方案，本发明提供了由磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，稳定的ACC，用于作为细胞培养基的补充剂使用，并且从而能够促进干细胞的分化，特别是MBA13向成骨细胞的分化。

[0143] 根据一些实施方案，本发明提供了由磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，稳定的ACC，用于作为用于精子分离、洗涤或成熟培养基的补充剂使用，所述培养基例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基、改良的具有庆大霉素的HTF培养基，并且从而能够促进精子细胞的成熟，例如促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。

[0144] 本发明提供了由磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合，稳定的ACC，用于作为培养基例如DMEM/F12或具有10％胎牛血清(FBS)、2mM谷氨酰胺、25μg/mL庆大霉素和0.3-0.5％NVR-Gel的DMEM/F12的补充剂使用，从而促进卵巢的保存。

[0145] 根据一些实施方案，稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约

0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM。

[0146] 根据又另一方面，本发明提供了细胞培养基补充剂，其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)。

[0147] 根据一个实施方案，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂在培养基制备期间被添加到培养基中。根据另一个实施方案，补充剂在使用前被添加到培养基中。

[0148] 根据一些实施方案，细胞培养基补充剂是固体补充剂。根据其他实施方案，补充剂是液体或半液体补充剂。

[0149] 根据上述实施方案中的任何一个，ACC由至少一种如以上定义的稳定剂稳定。根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐例如三磷酸盐、磷酸化的氨基酸例如磷酸丝氨酸、二磷酸盐、柠檬酸以及它们的任意组合例如三磷酸盐和柠檬酸的组合或磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合。

[0150] 包含稳定的ACC的本发明的细胞培养基补充剂可以被添加到上文描述的任何细胞培养基中。在一个实施方案中，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂可以被添加到适合于生长生物培养物的细胞培养基中，所述生物培养物例如细胞的培养物、组织培养物、器官培养物或器官。细胞可以是真核细胞或原核细胞。具体而言，细胞培养基是指适合于真核细胞培养物、组织培养物或器官生长的培养基。根据一些实施方案，细胞培养物是悬浮或贴壁细胞培养物。在一些特定的实施方案中，培养基可以是完全培养基、基础培养基、补充有细胞培养基补充剂的基础培养基、具有各种量的血清的培养基或化学限定培养基。

[0151] 根据一些实施方案，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂能够促进细胞或组织的生长。因此，在一个实施方案中，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂能够促进细胞、组织和器官的增殖、成熟、繁殖、再生、发育和/或分化。根据一个实施方案，补充剂能够促进干细胞的分化。根据另一个实施方案，补充剂能够促进细胞的培养物的增殖。根据又另一个实施方案，补充剂能够促进细胞或组织的成熟和/或发育。根据某些实施方案，补充剂能够促进细胞的再生。根据一些实施方案，细胞是真核生物细胞。根据一个实施方案，真核生物细胞是动物、植物和昆虫细胞。根据另外的实施方案，动物细胞的培养物选自人或非人哺乳动物的细胞培养物、组织培养物、器官培养物、干细胞、配子、胚胎和器官。根据一些实施方案，哺乳动物是人，并且人细胞的培养物选自人细胞、组织培养物和器官培养物。根据另一个实施方案，哺乳动物是非人哺乳动物。根据一些实施方案，细胞培养物，人或非人哺乳动物细胞培养物选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞、配子和血细胞的细胞培养物。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数，例如细胞的增殖、成熟、发育或分化提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。根据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0152] 根据一些实施方案，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂可以被添加到适合于酵母生长的细胞培养基，并且所述细胞培养基选自YPD、YPG和YPAD。

[0153] 根据一些实施方案，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂可以被添加到适合于原核生物生长的细胞培养基，并且所述细胞培养基选自LB和M9。

[0154] 根据一些实施方案，包含稳定的ACC的细胞培养基补充剂能够促进酵母和细菌的生长。

[0155] 根据一些更具体的实施方案，本发明提供了包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基补充剂，其中所述剂选自磷酸化的氨基酸、聚磷酸盐、二膦酸盐、有机酸以及它们的任意组合。根据一些实施方案，补充剂被添加到适合于(i)肌肉、神经或骨细胞或组织培养物；(ii)人或非人哺乳动物胚胎；(iii)干细胞；(iv)配子或(v)卵巢的生长的细胞培养基中。根据一些实施方案，稳定剂是磷酸丝氨酸。根据另一个实施方案，稳定剂是三磷酸盐。根据又另一个实施方案，稳定剂是磷酸丝氨酸与有机酸例如柠檬酸的组合。根据另外的实施方案，稳定剂是三磷酸盐例如三磷酸钠与有机酸例如柠檬酸的组合。根据更特定的实施方案，细胞培养基补充剂能够促进细胞的生长，例如增殖、分化、发育或成熟。根据一个实施方案，这样的细胞培养基补充剂能够促进受损神经细胞的再生。根据另一个实施方案，这样的细胞培养基补充剂能够促进肌管形成和/或推动肌管收缩性的开始。根据另外的实施方案，这样的细胞培养基补充剂能够促进胚胎例如人胚胎的发育。根据另外的实施方案，这样的细胞培养基补充剂能够促进配子和特别是精子的成熟或保存。根据一个特定的实施方案，如上文所描述，这样的细胞培养基补充剂能够促进胚胎或配子的冷冻保存。根据一个实施方案，这样的细胞培养基适合于干细胞的增殖和分化。根据一些实施方案，干细胞选自胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞。根据另一个实施方案，这样的细胞培养基补充剂能够促进干细胞的分化。根据一个特定的实施方案，这样的细胞培养基补充剂能够促进干细胞例如MBA13向成骨细胞的分化。根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数，例如细胞的增殖、成熟、发育或分化提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。根据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0156] 根据一些实施方案，本发明提供了包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基补充剂，所述稳定剂选自磷酸丝氨酸、依替膦酸或三磷酸钠，任选地与柠檬酸组合。根据一个实施方案，补充剂被添加到卵裂、单培养物或连续培养基中，以此促进人胚胎的发育。根据一个实施方案，补充剂被添加到用于精子分离、洗涤或成熟的培养基中，所述培养基例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基或改良的具有庆大霉素的HTF培养基，以此促进配子并且特别是精子的成熟或保存。根据另一个实施方案，将这样的补充剂添加到适合于神经细胞生长的细胞培养基中，以此促进神经细胞的再生。根据另一个实施方案，补充剂被添加到DMEM/F12培养基或任选地还补充有马血清(HS)、L-谷氨酰胺、庆大霉素和胰岛素的DMEM/F12培养基，以此促进骨骼肌细胞中肌管的形成，例如在杜氏肌营养不良症的情况下。根据又另一个实施方案，补充剂被添加到适合干细胞生长的细胞培养基中，从而促进干细胞的分化，特别是MBA13向成骨细胞的分化。根据其他实施方案，补充剂被添加到培养基中，例如DMEM/F12或具有10％胎牛血清(FBS)、2mM谷氨酰胺、25μg/mL庆大霉素和0.3-0.5％NVR-Gel的DMEM/F12，从而促进卵巢的保存。根据一些实施方案，稳定的ACC在细胞培养基中的最终浓度为约0.1至约8mM、约0.5至约6mM、约1至约5mM或约2至约4mM。

[0157] 根据上述实施方案中的任何一个，术语“包含/包括(comprise)”具有“由其组成(consist)”的含义，因此根据这样的实施方案，细胞培养基补充剂由被至少一种稳定剂稳定的ACC组成。

[0158] 根据另外的方面，本发明提供了由至少一种稳定剂稳定，并被配制成用于细胞培养基的补充剂的无定形碳酸钙(ACC)。

[0159] 根据某些方面，本发明提供了用于促进生物培养物生长的方法，所述方法包括将所述培养物暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC。根据一个实施方案，生物培养物选自真核生物细胞、组织或器官和原核生物细胞。

[0160] 根据其他实施方案，该方法包括促进生物培养物例如细胞、组织和器官的生长，例如促进其增殖、成熟、繁殖、再生、分化和/或发育。

[0161] 根据一个实施方案，细胞的培养物选自动物、植物或昆虫细胞培养物。根据另一个实施方案，组织培养物选自动物、植物或昆虫组织培养物。根据另外的实施方案，器官培养物选自动物、植物或昆虫器官培养物。根据一些实施方案，动物是人或非人哺乳动物。根据某些实施方案，非人哺乳动物选自家畜动物，例如牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛或骆驼；家养宠物，例如猫或狗；啮齿类动物，例如小鼠、大鼠、豚鼠或仓鼠；兔形目动物，例如兔；以及灵长类动物，例如猴(例如猕猴)或猿(例如黑猩猩)。

[0162] 根据一些实施方案，哺乳动物细胞培养物，人或非人哺乳动物细胞培养物选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞、配子和血细胞的细胞培养物。根据一个实施方案，组织培养物选自上皮组织、结缔组织、肌肉组织和神经组织培养物。根据一些更特定的实施方案，组织培养物选自肾、肝、腺、脑、骨、眼和肌肉组织培养物。根据一些实施方案，器官组织或器官选自卵巢、角膜、心脏、肾、胰腺、肝、脾、肺、睾丸、膀胱和血泡。在一个特定的实施方案中，器官组织或器官是卵巢。

[0163] 根据一个实施方案，本发明提供了用于促进肌细胞生长的方法。根据另一个实施方案，促进肌细胞的生长包含促进肌管形成。根据一些实施方案，该方法包括还减少所述肌管自发收缩活动开始的时间。自发收缩活动开始的时间被定义为成肌细胞融合并开始自发收缩所需的时间。在一个实施方案中，由所述成肌细胞形成的肌细胞选自骨骼肌细胞或心肌细胞。在更特定的实施方案中，肌细胞是骨骼肌细胞。根据一些实施方案，该方法包括促进骨骼肌细胞中肌管的形成和/或收缩性的开始，例如在杜氏肌营养不良症的情况下。

[0164] 根据其他实施方案，该方法包括促进神经细胞的生长。在一个实施方案中，促进神经细胞的生长包含促进和加速神经细胞再生。因此，在一个实施方案中，该方法包括促进外周和中枢神经系统的轴突和树突神经元纤维的再生长，和/或从受损的神经元纤维发芽。

[0165] 根据一些实施方案，该方法包括促进配子的成熟或保存，例如促进精子或卵母细胞的体外成熟或保存。根据一些实施方案，配子选自人配子或非人哺乳动物配子。根据一个实施方案，配子是精子。因此，在一个实施方案中，本发明提供了促进精子成熟或改善精子质量的方法，所述方法包括将所述培养物暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC。

[0166] 根据一个实施方案，改善精子质量选自由以下组成的组：促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数以及它们的任意组合。

[0167] 根据一些实施方案，增加精子计数包括增加在运动性或前向运动性程序中的精子计数。根据一个实施方案，运动性或前向运动性程序是上游程序。

[0168] 根据上述实施方案中的任何一个，精子是人或非人哺乳动物的精子。根据一些实施方案，非人哺乳动物选自由家畜动物、家养宠物、啮齿类动物、野生动物和灵长类动物组成的组。

[0169] 在一个实施方案中，家畜动物选自牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛和骆驼。在一些其他实施方案中，家养宠物是猫或狗，啮齿类动物是大鼠、小鼠、豚鼠或仓鼠，兔形目动物是兔，且灵长类动物是猴例如猕猴或猿例如黑猩猩。

[0170] 根据另一个实施方案，精子是非哺乳动物的精子。根据一些实施方案，非哺乳动物选自由鱼、昆虫和鸟组成的组。

[0171] 根据一个实施方案，精子是人精子。根据其他实施方案，该方法包括促进体外胚胎发育。

[0172] 根据一些实施方案，该方法包括促进干细胞的分化和/或增殖。根据一些实施方案，干细胞选自胚胎干细胞、绒毛膜干细胞、羊膜干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、胶质干细胞、成体干细胞和诱导的多能干细胞。根据一个实施方案，该方法包括促进干细胞例如MBA13向成骨细胞的分化。

[0173] 根据一个实施方案，补充有稳定的ACC的细胞培养基能够将生长参数，例如细胞的增殖、成熟、发育或分化提高约10％至约600％、约20％至约500％、约30％至约400％、约40％至约300％、约50％至约200％、约60％至约150％或约70％至约100％。根据一些实施方案，将生长参数提高约100％至约500％、约120％至约400％、约150％至约300％。

[0174] 根据一些实施方案，细胞的培养物是细菌或酵母的培养物，因此根据这样的实施方案，该方法包括促进酵母或细菌的生长。在一些实施方案中，细菌是大肠杆菌或益生菌，例如双歧杆菌属和乳酸杆菌属的细菌。

[0175] 根据上述实施方案中的任何一个，将细胞暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC，包括将所述ACC添加到细胞培养基中。术语“暴露于”和“与...接触”在本文中可互换地使用，是指将细胞放置或转移到包含感兴趣组分(例如稳定的ACC)的培养基中，或将组分(例如稳定的ACC)添加到细胞生长或培养在其中的培养基中。细胞培养基可以是本领域中任何已知的培养基。根据某些实施方案，培养基如上文所定义。根据一个实施方案，细胞培养基选自天然培养基和人工培养基。根据一些实施方案，天然培养基包含选自血浆、血清、淋巴、人胎盘脐带血清和羊水的生物流体。根据另一个实施方案，天然培养基包含组织提取物，例如肝、脾、肿瘤、白细胞和骨髓的提取物，牛胚胎和鸡胚胎的提取物。根据另外的实施方案，天然培养基包含凝结剂或血浆凝块。根据一些实施方案，培养基是补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的人工培养基。根据一个实施方案，人工培养基是平衡的盐溶液。平衡的盐溶液的实例是PBS、DPBS、HBSS、EBSS Tyrode的T6、WM1、Pool的P1、Quinn的HTF和Gardner的G1。根据另一个实施方案，人工培养基是基础培养基。根据一些实施方案，如本领域公知的，可以进一步补充培养基。根据一个实施方案，培养基补充有血清，例如胎牛血清。根据另外的实施方案，人工培养基是复合培养基。

[0176] 根据一个实施方案，人工培养基是无血清培养基。根据另外的实施方案，人工培养基是具有降低的血清含量的培养基。根据另一个实施方案，人工培养基是无蛋白培养基。

[0177] 根据一个实施方案，该方法包括向细胞培养基添加稳定的ACC，所述细胞培养基选自DMEM、EMEM、RPMI 1640培养基、Eagle基础培养基(BME)、Ham氏F-10、Ham氏F-12、DMEM/F-12、IMDM、opti-MEM、GMEM、IPL-41昆虫培养基、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、无血清昆虫培养基、Sf-900、TC-10、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基、IPL-10、单培养物培养基，例如Quinn’s Advantage™(SAGE)培养基1-Step™

或连续培养基，例如Quinns Quinn's Advantage™卵裂培养基、Murashige和Skoog(MS)、B5、N6、Nitsch培养基、NCTC培养基、MegaCell培养基、Claycomb、Click培养基、L-15培养基、培养基199、MCDB培养基、Ames培养基、BGJb培养基、Click培养基、CMRL-1066培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、Swim的S-77培养基、Waymouth培养基、Willliam的培养基E、体外成熟培养基、Menezo的B2和B3培养基、Behr的胚泡培养基、Gardner的G2、通用IVM(ORIGIO)和用于胚胎生长的连续培养基。根据一个实施方案，该方法包括将稳定的ACC添加到细胞培养基中，所述细胞培养基选自用于精子分离的培养基、用于精子洗涤的培养基和用于成熟的培养基，例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基、改良的具有庆大霉素的HTF培养基。根据一个实施方案，该方法包括向选自用于受精的培养基、用于胚胎发育的培养基或用于胚胎或/和配子成熟、处理和/或冷冻保存的培养基的细胞培养基中添加稳定的ACC。

[0178] 在一些实施方案中，细胞作为固定(stationary)或固定的(immobilized)培养物生长在载体上，例如Cytodex 1或3、Cytopore 2、聚苯乙烯、明胶、葡聚糖、聚丙烯酰胺或其他替代载体。

[0179] 根据一些实施方案，细胞培养基适合于单细胞真核生物的生长。根据一个实施方案，单细胞真核生物是酵母例如酵母菌，更特定地是酿酒酵母菌。根据一个实施方案，该方法包括将稳定的ACC添加到适合于单细胞真核生物(例如酿酒酵母菌)生长的细胞培养基中，所述细胞培养基选自酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YPD)、酵母提取物蛋白胨甘油(YPG)和酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YPAD)培养基。

[0180] 根据一些实施方案，细胞培养基适合于原核生物的生长，例如细菌是大肠杆菌或益生菌，例如双歧杆菌属和乳酸杆菌属的细菌。根据一个实施方案，该方法包括将稳定的ACC添加到适合于细菌生长的培养基中，例如LB或M9。

[0181] 根据上述实施方案中的任何一个，将稳定的ACC添加到根据上述实施方案中的任何一个的细胞培养基中，最终浓度为约0.1至约20mM、约0.5至约15mM、约1至约10mM、约2至约8mM、约3mM至约6mM或约4mM至约5mM。在更特定的实施方案中，稳定的ACC以0.5至约4mM、约1至约3mM、约1.5至约2.5或约1、1.5、2或2.5mM的浓度存在。

[0182] 根据一个实施方案，ACC以固体、液体或半液体的形式被配制。在一个特定的实施方案中，稳定的ACC以悬浮液的形式被添加。在又另一个实施方案中，悬浮液是新鲜制备的悬浮液。

[0183] 根据上述实施方案中的任何一个，ACC由至少一种以上定义的稳定剂稳定。在某些实施方案中，ACC稳定剂每次出现时独立地是有机酸；磷酸化、膦酸化、硫酸化或磺化的有机化合物；羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯；有机胺化合物；包含羟基的有机化合物；有机磷化合物或其盐；磷酸化的氨基酸及其衍生物，二膦酸盐；有机磷酸盐化合物；有机膦酸盐化合物；有机聚磷酸盐、无机聚磷酸盐、无机亚磷酸、具有如上文所定义的多个官能团基团的有机化合物；无机磷酸盐和聚磷酸盐化合物；具有聚磷酸链的有机化合物；有机表面活性剂；生物必需无机离子；糖类及其衍生物、蛋白、磷酸化的蛋白、天然和合成生物聚合物及其衍生物或它们的任意组合。根据另一个实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：磷酸丝氨酸、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷、植酸、柠檬酸、依替膦酸、焦磷酸盐、聚磷酸盐、三磷酸盐、乙醇、六偏磷酸盐、几丁质以及它们的任意组合。这些化合物如上文所定义。根据一些实施方案，ACC由多

于一种稳定剂稳定，例如由2或3种稳定剂稳定。

[0184] 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐例如三磷酸盐、磷酸化的氨基酸例如磷酸丝氨酸、二磷酸盐、柠檬酸以及它们的任意组合例如三磷酸盐和柠檬酸的组合或磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合。

[0185] 根据另一方面，本发明提供了制备包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的细胞培养基的方法，所述方法包括将稳定的ACC添加到细胞培养基中。

[0186] 根据某些方面，本发明提供了包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)以及用于所述ACC与细胞培养基组合使用的说明书的试剂盒。根据一个实施方案，稳定的ACC是用于作为细胞培养基补充剂使用的ACC。根据一个实施方案，本发明提供了包含氯化钙、碳酸钠、至少一种稳定剂以及用于由所述氯化钙、碳酸钠、至少一种稳定剂制备稳定的ACC的说明书以及用于所述稳定的ACC与细胞培养基组合使用的说明书的试剂盒。根据一个实施方案，氯化钙、碳酸钠和/或至少一种稳定剂作为水溶液存在。

[0187] 根据另一个实施方案，试剂盒包含含有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基补充剂和用于所述补充剂与细胞培养基组合使用的说明书。根据一个实施方案，细胞培养基补充剂由由至少一种稳定剂稳定的ACC组成。

[0188] 根据上述实施方案中的任一个，试剂盒还包含如上文所定义的细胞培养基。因此，在一个实施方案中，试剂盒包含由至少一种稳定剂稳定的ACC、细胞培养基和用于使用的说明书。在其他实施方案中，试剂盒包含含有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基补充剂、培养基和用于使用的说明书。

[0189] 由至少一种稳定剂稳定的ACC和细胞培养基如上文所描述。

[0190] 根据一些实施方案，稳定剂选自由以下组成的组：聚磷酸盐例如三磷酸盐、磷酸化的氨基酸例如磷酸丝氨酸、二磷酸盐、柠檬酸以及它们的任意组合例如三磷酸盐和柠檬酸的组合或磷酸丝氨酸和柠檬酸的组合。

[0191] 根据一些实施方案，ACC组合物包含上文公开的稳定剂的组合。

[0192] 根据上述实施方案中的任何一个，稳定的ACC可以被配制成固体、液体或半液体制剂。因此，在一个实施方案中，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC被配制成固体、液体或半液体。根据一些实施方案，稳定的ACC被配制成固体形式，例如粉末、片剂、胶囊或颗粒。因此，在一个特定的实施方案中，用于作为细胞培养基的补充剂使用的稳定的ACC被配制成粉末。根据其他实施方案，用于作为补充剂使用的稳定的ACC被配制成液体或半液体。根据一个实施方案，液体形式是悬浮液或乳液，并且半液体形式是凝胶或胶体。在一个具体实施方案中，稳定的ACC被配制成悬浮液。因此在一个实施方案中，在使用该培养基之前，将被配制成粉末或配制成悬浮液的稳定的ACC添加到细胞培养基中。根据一个甚至更具体的实施方案，稳定的ACC作为新鲜制备的悬浮液添加。

[0193] 本发明的试剂盒还可以包含细胞培养基。细胞培养基是本领域公知的，并且可以使用任何培养基。在一些实施方案中，细胞培养基适合于生长生物培养物，所述培养物选自细胞的培养物、组织培养物、器官培养物或器官。细胞的培养物可以是真核或原核细胞的培养物。具体而言，细胞培养基是指适合于真核细胞培养物、组织培养物或器官生长的培养基。在一些特定的实施方案中，培养基可以是完全培养基、基础培养基、补充有细胞培养基补充剂的基础培养基、具有各种量的血清的培养基或化学限定培养基。

[0194] 根据一些实施方案，细胞培养基选自DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、L-15培养基(Leibovitz)、MCDB培养基、培养基199、opti-MEM和DMEM/F-12、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、IPL-41昆虫培养基Sf-900、无血清昆虫培养基、Shields和Sang M3昆虫培养基、TC-100昆虫培养基、TNM-FH昆虫培养基、Ham氏F-12、Ham氏F-10、GMEM、Ames培养基、Eagle基本培养基(BME)、Claycomb、Click培养基、Glasgow最少必需培养基(GMEM)、MegaCell培养基、McCoy氏5A改良培养基、NCTC培养基、Williams培养基E、Waymouth培养基、TC-10和IPL-10培养基。在一个特定的实施方案中，细胞培养基选自单培养物培养基，例如Quinn's Advantage™(SAGE)培养基1-Step™、连续培养基，例如Quinn's Advantage™卵裂培养基、MEDICULT、通用IVM、DMEM、RPMI 1640、MEM、IMDM、opti-MEM、GMEM、Ham氏F-12、DMEM/F-12、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、Sf-900、TC-10、IPL-10、B5、N6或Nitsch培养基。培养基的另外实例是用于精子分离的培养基，例如ISolate®、PureCeption™、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)、Quinns™精子洗涤培养基、Multipurpose Handling Medium® (MHM®)和改良的具有庆大霉素的HTF培养基-HEPES。根据其他实施方案，培养基是用于卵母细胞成熟的培养基，例如SAGE™体外成熟培养基(IVM)和BO-IVM卵母细胞成熟培养基。根据另外的实施方案，细胞培养基选自用于受精的培养基、用于胚胎发育的培养基以及用于胚胎或/和配子成熟、处理和/或冷冻保存的培养基。

[0195] 根据一些实施方案，细胞培养基适合于酵母生长，并且所述细胞培养基选自YPD、YPG和YPAD。

[0196] 根据一些实施方案，细胞培养基适合于原核生物的生长，所述培养基选自LB和M9。

[0197] 根据一个实施方案，本发明提供了包含氯化钙、碳酸钠、至少一种稳定剂以及用于制备稳定的ACC的说明书以及用于所述ACC与细胞培养基组合使用的说明书的试剂盒。根据一些实施方案，氯化钙和碳酸钠作为水溶液存在。根据一个实施方案，至少一种稳定剂作为一种或两种单独的溶液存在。根据一个实施方案，用于制备ACC的说明书包含用于将包含氯化钙和至少一种稳定剂的溶液与碳酸钠溶液混合并进一步添加包含至少一种稳定剂的溶液的说明书。

[0198] 根据本发明的一些实施方案，术语“能够促进”和“促进”在一些实施方案中可互换使用。

[0199] 在上述实施方案的任何一个中，术语“包含(comprising)”包括“由其组成(consisting)”的含义，并且可以被其取代。

[0200] 如本文所用，术语“约”在指例如量、时间的持续长度等可测量值时，意指涵盖从指定值的+/-10%、或+/-5%、或+/-1%、或甚至+/-0.1%的变化。

[0201] 现已一般性描述了本发明，通过参考以下实施例将更容易理解本发明，以下实施例通过说明性方式来提供，而不意图限制本发明。

实施例

[0202] 实施例1.ACC对SC-DRG共培养物的影响

[0203] 方法

[0204] 培养基

[0205] 培养基包括:90%Dulbecco氏改良的eagle培养基-营养混合物F-12(DMEM-F12)脱钙的(无钙离子的培养基,特定制剂),10%热灭活的胎牛血清(FBS),6g/L D-葡萄糖,2mM谷氨酰胺,25μg/mL庆大霉素和0.05ng/mL胰岛素样生长因子1(IGF-I)(均购自Biological-Industries,以色列)。

[0206] NVR-Gel作为神经元培养的基质

[0207] 神经和血管重建凝胶(NVR-Gel,NVR Labs所有)包括两种主要组分:高分子透明质酸(HA,3x10^{6}Da,BTG,以色列)和层粘连蛋白(Sigma)。对于神经元细胞培养,1%的NVR-Gel被培养基稀释至0.3-0.5%的最终浓度。凝胶具有粘稠液体的质地,它容易地且成功地将包埋的细胞或分离块粘附到塑料或玻璃底材上,并使得神经纤维能够以3D模式长出。

[0208] 神经元组织培养物的制备

[0209] 所有实验由以色列当局认可的关于动物实验的当地伦理委员会授权并进行。从大鼠胎儿(妊娠15天,Lewis近交系,以色列哈兰)制备背根神经节(DRG)和脊髓(SC)的固定器官型培养物以及解离的脑细胞的培养物。解剖后,立即用Macwain组织切碎机将分离的组织切成(厚400μm的)小切片。在这些研究中,使用了两种组织培养策略。在第一种方法中,将组织切片直接接种到12孔培养板中,所述培养板包含1mL含有0.3%-0.5%NVR-Gel的培养基。在第二种方法中,用胰蛋白酶-EDTA溶液进一步解离组织切片持续30分钟,并用培养基洗涤。随后,将解离的细胞添加到壳聚糖粉末或胃石粉末(微载体,MC)的悬浮液中,并在37℃悬浮孵育持续4天。然后收集形成的漂浮细胞/MC聚集体,并接种在12孔培养板中,所述培养板包含1mL含有0.3%-0.5%NVR-Gel的培养基。

[0210] Ca^{2+}补充剂来源

[0211] 在接种阶段向凝胶中添加一次最终浓度为1或2mM的Ca^{2+}源(下面列出),并且然后在每次连续喂食时添加到营养培养基中。钙源如下:ACC-依替膦酸(ACC-ET)(新鲜悬浮液);ACC-磷酸丝氨酸(ACC-PS)(新鲜悬浮液);胃石(用0.1M HCl溶解,并且然后用1M NaOH中和);胃石粉末;CCC-结晶碳酸钙的水性悬浮液(商业纳米颗粒粉末);和$CaCl_2$溶液-对照。

[0212] 从设置培养物开始后的24小时开始,通过每日的相差显微镜观察来监测培养物。

[0213] 新鲜ACC制剂的悬浮液由形成稳定悬浮液的颗粒组成。胃石是从螃蟹中分离出的天然ACC,并只能作为干燥粉末购买。在这种形式中,细胞无法获得它的其他特征成分(例如钙离子和蛋白)。为了提高它们的生物利用度,将胃石粉末溶于0.1M HCl(其模拟胃中存在的酸性)中,并且然后用1M NaOH中和。

[0214] 神经元培养物的免疫荧光染色

[0215] 移除培养基后,用磷酸盐缓冲的盐溶液(PBS)洗涤背根神经节(DRG)培养物,并在4%多聚甲醛中固定持续15分钟,并且然后用PBS再次洗涤。用在PBS中的0.1%Triton X-100使固定的细胞透化,并且然后在室温用在PBS中的1%牛血清白蛋白(BSA)免疫封闭(避免非特异性染色)持续1小时。然后将样本与兔抗神经丝抗体(NF,Novus Biologicals,1:500)孵育,以可视化神经突长出。将一级抗体稀释于在PBS中的0.1%BSA和0.05%Tween-20(稀释剂缓冲液)中,并在4℃与样本一起孵育过夜。在用在PBS中的0.05%Tween-20(洗涤缓冲液)冲洗后,DRG样本在室温与二级抗体Alexa-Fluor-594缀合的驴抗兔IgG(Jackson ImmunoResearch,美国,在稀释剂缓冲液中1:800)孵育1小时。最后,用洗涤缓冲液再次冲洗样品,并用封固介质(Immco Diagnostic,美国)封固。所有的图像用Olympus IX70显微镜观

察。

[0216] 结果

[0217] 在SC-DRG共培养物中检查各种钙制剂的效果。一般来说，培养物包含400微米的SC切片，连同附着的或分离的DRG切片。可以认为，与CCC和$CaCl_2$相比，所有被检查的ACC制剂(ACC-ET、ACC-PS和胃石)显著地促进了神经元纤维再生。表1示出了在各种钙制剂(2mM的Ca^{2+}浓度)的存在下或在单独的稳定剂(稳定剂(从5％的储备溶液)以0.05％的浓度添加到每个孔中)的存在下的4天的培养后呈现神经纤维发芽的分离块的比例(6个中)。可以看出，在暴露于ACC-ET的培养物中观察到最强烈的发芽(100％的分离块)，其次是暴露于ACC-PS和胃石的培养物(66.6％的分离块)。CCC和$CaCl_2$仅从50％的分离块诱导了神经元发芽，并且单独的稳定剂诱导了甚至更低的百分比(0-33％)。在培养物建立期间(第一周培养之后)，主要在暴露于各种ACC制剂的培养物中(图1)，再生的神经纤维变得更长、更厚并产生分枝，直到神经元网络的形成。

[0218] 表1:ACC制剂对从SC-DRG共培养物的早期神经纤维发芽的影响。

[0219]

钙制剂的类型	具有轴突再生的培养物(%)
ACC-ET (新鲜悬浮液)	100
ACC-PS (新鲜悬浮液)	66.6

[0220]

胃石	66.6
CCC (结晶碳酸钙)	50
$CaCl_2$ 水溶液(对照)	50
ET	33.3
PS	0

[0221] 实施例2.ACC对脑培养物的影响

[0222] 研究了ACC对在悬浮液中4天后接种在凝胶中的脑细胞-MC聚集体培养物的影响(参见实施例1的方法部分)。结果在图2中呈现，并且示出ACC比氯化钙更显著地促进了神经纤维再生。当比较两种处理之间神经纤维的数量和长度时，这一点尤其显著。

[0223] 实施例3-ACC制剂对健康骨骼肌细胞的影响

[0224] 方法

[0225] 骨骼肌培养物的制备

[0226] 从健康的1天的新生大鼠(Sprague Dawley，哈兰，以色列)制备固定的骨骼肌培养物。从后腿解剖肌肉组织并彻底切碎(minced)。用胰蛋白酶-EDTA进行消化，同时轻轻研磨。30分钟后，收集含有解离的细胞的上清液，并加入新鲜的胰蛋白酶-EDTA。将这个程序又重复两次。然后，汇集所有上清液，离心，并将细胞沉淀物重新悬浮在增殖培养基中。将细胞接种在明胶涂覆的含有1mL增殖培养基的12孔培养板中，1×10^5个细胞/孔。两天后，将培养基更换为融合培养基，然后其每周被换两次。从设置培养物的24小时后开始，通过每日的相差显微镜观察来监测培养物。在预先决定的日期，将培养物固定在甲醇中持续20分钟，并且然后用姬姆萨染色，以评估随着时间的推移在培养物中形成的肌管的数量。

[0227] 涂有明胶的培养板

[0228] 将在水中的1％猪明胶储备溶液用高压釜灭菌。一旦冷却，将500μl溶液添加到12孔培养板的每个孔中。室温孵育持续20分钟后，移除过量溶液，并接种细胞。

[0229] 增殖培养基

[0230] 对于增殖阶段，将细胞培养在：DMEM/F12(包含1mM Ca^{2+})+10％FBS、25μg/mL庆大霉素以及2mM L-谷氨酰胺中。

[0231] 融合培养基

[0232] 对于融合阶段，将增殖培养基换为融合培养基，其如下制备：DMEM/F12(包含1mM Ca^{2+})、2％马血清(HS)、2mM L-谷氨酰胺、25μg/mL庆大霉素、和4单位/100mL胰岛素(均购自Biological-Industries，以色列)。

[0233] 测试的钙制剂的列表

[0234] 用表2中列出的、Ca^{2+}浓度在1mM的各种钙制剂使融合培养基富化(由于培养基已经含有1mM的钙离子，Ca^{2+}的最终浓度为2mM)。对照培养物在没有进一步添加钙的情况下生长，或者培养物用游离(可溶性)稳定剂富化。通过仅用任意数字标记各种钙制剂来使实验为盲性的。

[0235] 以下列方式之一添加组分：(i)干燥物质的水性悬浮液；(ii)新鲜物质的水性悬浮液(干燥前)，或(iii)用HCl溶解(以模拟胃中存在的酸性。溶解完成后，用1M NaOH中和所形成的溶液)。

[0236] 表2-测试的材料列表

[0237]

添加的物质	总钙浓度(mM)，包括培养基中的1 mM Ca^{2+}离子
ACC-依替膦酸(ACC-ET)	2
ACC-焦磷酸盐(ACC-PyP)	2
ACC-磷酸丝氨酸(ACC-PS)	2
ACC-三磷酸腺苷(ACC-ATP)	2
ACC-二磷酸腺苷(ACC-ADP)	2
ACC-植酸	2
ACC-柠檬酸	2
结晶碳酸钙(CCC)(可商购的粉末)	2
$CaCl_2$水性溶液	2
ET	1
PyP	1
PS	1
ATP	1
ADP	1

[0238]

植酸	1
柠檬酸	1
对照	1

[0239] 结果

[0240] 干ACC对健康骨骼肌的影响

[0241] 在第一阶段，使用干燥的ACC粉末。将粉末(根据以其制剂使用的稳定剂列于表2中)悬浮在水中，并且然后以1mM的浓度添加到培养基中。由于培养基中已经含有1mM的钙离子，则Ca^{2+}的最终浓度是2mM。一些结果示出在图3(左手侧)中，揭示了暴露于ACC的培养物在

培养的4天内已经呈现出许多肌管的早期形成，不同的ACC制剂之间没有显著差别。在暴露于添加的CCC或$CaCl_2$的对照培养物中，较晚观察到肌管的形成。7天后，用ACC处理的培养物呈现出大量长而厚的肌纤维，而在用CCC和$CaCl_2$处理的培养物中，形成了更少、更薄和更短的肌纤维(图3；右手侧)。

[0242] 还应注意，在暴露于ACC制剂的培养物中，在接种后第7天已经观察到肌肉收缩，而在暴露于添加的CCC或$CaCl_2$的培养物中，肌肉收缩仅在10天或更长时间后才出现。

[0243] 从以上体外结果可以得出结论：所有ACC制剂促进了健康横纹肌培养物的肌管形成和早期肌肉收缩性。

[0244] 实施例4-评估ACC对杜氏肌营养不良症肌细胞系的影响-体外研究

[0245] 方法

[0246] Mdx细胞制备

[0247] 研究了不同钙制剂对mdx细胞系(杜氏肌营养不良症模型)的影响，所述细胞系由以色列魏茨曼科学研究所(Weizmann Institute of Science)名誉教授戴维·亚夫(Prof.(Emeritus)David Yaffe)友好地提供。

[0248] 将来自Mdx细胞系的细胞接种在明胶涂覆的含有1mL增殖培养基的12孔培养板中，3×10^4个细胞/孔。两天后(～66％汇合)，将培养基更换为融合培养基，然后其每周被更换两次。根据表3中描述的处理，将各种钙制剂单独地添加到融合培养基中。用Ca^{2+}浓度在1mM的各种钙制剂使培养物富化。由于培养基中已经含有1mM的钙离子，则Ca^{2+}的最终浓度是2mM。

[0249] 表3：钙源

[0250]

处理	钙源(2mM)
对照	$CaCl_2$
ACC-ET	无定形碳酸钙-依替膦酸
ACC-PS	无定形碳酸钙-磷酸丝氨酸

[0251] 通过每日的相差显微镜观察，监测被测试的钙制剂对细胞增殖、融合以形成肌管和肌肉收缩的影响。在预先决定的日期，将培养物固定在甲醇中持续20分钟，并且然后用姬姆萨染色，以评估随着时间的推移在培养物中形成的肌管的数量。

[0252] 在肌肉组织培养物中的肌酸激酶(CK)分析

[0253] 在肌细胞培养物中，CK是肌管形成的指示物，并且CK水平以与肌肉培养物中肌管形成的进展直接相关地增加(在组织培养板中)。在预先决定的日期，从培养孔(使用橡胶刮棒(rubber policeman))收集细胞，并在-70℃保存在1mL PBS(不含Ca^{2+})中，直到被分析。对于CK测量，将细胞样品解冻并使用超声波仪物理裂解，以从肌肉肌管释放CK。使用肌酸激酶活性测定试剂盒(CK-NAC REAGENT SET，CURTISS，CHEM-INDEX INC，Hialeah，FL，美国)确定CK浓度。

[0254] 结果

[0255] 上述实验的结果呈现于图4和图5中。可以清楚地看出，ACC的添加比常规钙离子源($CaCl_2$)的添加更好地促进了细胞融合和肌管的形成。这一令人惊讶的结果在生化(CK活性)和形态学(显微术)分析两者中被证明(图4和图5)。此外，在暴露于ACC制剂的培养物中，

在接种后第7天已经观察到肌肉收缩，而在对照中，仅在10天或更长时间后才出现肌肉收缩。因此，可以得出结论，ACC补充具有治疗DMD患者的潜力。

[0256] 实施例5-钙源对原代mdx小鼠细胞的影响

[0257] 方法

[0258] 原代细胞的提取

[0259] 在无菌条件下，从新生(一天大)mdx小鼠的后腿移除大腿肌肉，并在PBS中洗涤以移除过量的血细胞。将肌肉切碎成小块。为了酶分解，将肌肉碎片放在含有胰蛋白酶-EDTA溶液(0.25mM)的烧杯中。为了确保细胞分离，将混合物置于搅拌器上，在室温，温和搅拌持续20分钟。收集汤，并在300×g离心持续5分钟。将沉淀物重新悬浮在含有FBS的DMEM中。将胰蛋白酶化(trypsinization)步骤再重复3个循环。将所有上清液合并到一个试管中。目视确定细胞分离(使用相差显微术)。用血细胞计数器确定细胞密度。

[0260] 将细胞以$2x10^5$个细胞/孔的浓度铺板在12孔板上。所使用的培养基为添加有15％FBS和2mM L-谷氨酰胺庆大霉素(25μg/ml)的DMEM/F12W/O Ca^{2+}。根据如表4中描述的处理，将钙单独地添加到培养基中。在第2天(～66％汇合)将培养基更换为融合培养基(DMEM/F12，不含Ca^{2+}，添加有10％HS、胰岛素(4单位/100ml)和庆大霉素(25μg/ml))。每3天更换一次培养基。

[0261] 表4.在原代细胞研究中使用的钙源

[0262]

处理	钙源(2mM)
对照	$CaCl_2$
ACC-PP	由聚磷酸盐稳定的无定形碳酸钙
ACC-PS	由磷酸丝氨酸稳定的无定形碳酸钙

[0263] 每天定性监测细胞增殖和融合。培养物在第2天、第3天、第4天、第5天和第7天固定，和用姬姆萨或用肌球蛋白抗体染色。

[0264] 结果

[0265] 结果呈现于图6和图7中。与对照相比，ACC制剂的有益效果通过肌管形成、特别是在早期时间点--第3天和第4天的肌管形成被证明。在第5天和第7天，形成的肌管中的差别变得不可区分。姬姆萨染色与肌球蛋白染色之间存在高相关性。

[0266] 在ACC补充的培养基中胚胎发育的促进

[0267] 实施例6.

[0268] 材料和方法：

[0269] 将CBA雄性小鼠与BL C57雌性小鼠交配。将小鼠保持在12小时的光周期时间表上，与不受限制的水和食物供应。在收到后代后约6至8周，将每只雌性小鼠IP注射5IU怀孕母马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin，PMSG)。

[0270] 48小时后，将每只雌性小鼠注射5IU人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin，hCG)。然后将被证明是可育的雄性小鼠与超排卵的(superovulated)雌性小鼠放在一起。第二天早上，检查雌性小鼠是否存在交配栓(copulatory plug)。在24小时后(交配后约36小时)将具有交配栓的雌性安乐死，并从输卵管中如下取出2细胞阶段的胚胎：在Quinn的Advantage卵裂培养基(SAGE，Origio，丹麦)中解剖输卵管，并将胚胎转移到具有

覆盖有矿物油的Quinn的Advantage卵裂培养基(SAGE,Origio,丹麦)的20μL液滴中,并在37.0℃在5%CO_2和大气氧下培养。收集的胚胎继续生长,即体外培养(IVC),直到胚泡/孵化阶段。为了测试无定形碳酸钙的效果,将Quinn的Advantage卵裂培养基(在下文中"卵裂培养基")补充有不同的添加剂,即由聚磷酸盐(ACC-PP)、结晶碳酸钙(CCC)、聚磷酸盐(PP)、磷酸丝氨酸(PS)或碳酸钠($NaCO_3$)稳定的无定形碳酸钙。所有补充剂作为新鲜制备的悬浮液添加;ACC补充剂的制备在无菌条件下进行。未处理的卵裂培养基(没有添加任何添加剂)用作对照(被标识为Cont Q)。每天通过显微镜观察评估胚胎,为了检测以下阶段:2细胞、致密化阶段、胚泡形成和孵化阶段。计算到达每个阶段的胚胎的比例(百分比)(将2细胞胚胎的数量设置为100%)。

[0271] 结果

[0272] 将补充有1.7mM用PP稳定的无定形碳酸钙(ACC-PP)的卵裂培养基中的胚胎发育与对照(Cont Q-未处理的培养基中的发育)进行比较。在每个发育阶段的胚胎数以及它们在最初胚胎数中的比例(后者用括号呈现)呈现在表5中。

[0273] 表5.在未处理的卵裂培养基与补充有ACC-PP培养基中胚胎生长的比较

[0274]

	2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3	孵化/d4
Cont Q	12	2(16.6)	10(83.3)	8(66.6)
ACC-PP	40	17(42.5)	40(100)	32(80)

[0275] 实施例7.

[0276] 将补充有1.7mM ACC-PP或氯化钙($CaCl_2$)的卵裂培养基中的胚胎发育在两个单独的测试(A和B)中进行测试。在测试A中,胚胎生长直到胚泡阶段,且在测试B中,胚胎生长直到孵化阶段。在每个发育阶段的胚胎数以及它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表6(测试A)和表7(测试B)中。

[0277] 表6:测试A:在补充有1.7mM $CaCl_2$或ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较

[0278]

	2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3
$CaCl_2$	25	16(64)	16(64)
ACC-PP	26	24(92.3)	22(84.6)

[0279] 表7:测试B:在补充有1.7mM $CaCl_2$或ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较

[0280]

	2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3	孵化/d4
$CaCl_2$	27	20(70)	20(74)	11(40.7)
ACC	23	23(100)	23(100)	23(100)

[0281] 实施例8.

[0282] 补充有1.7mM $CaCl_2$、1.7mM ACC-PP或0.85mM ACC-PP(ACC-PP初始浓度的一半,被标识为ACC-PP0.85)的卵裂培养基中的胚胎发育。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表8中。

[0283] 表8.在补充有1.7mM $CaCl_2$、1.7mM或0.85mM ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较。

[0284]

	2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3	孵化/d4
$CaCl_2$	10	3(30)	8(80)	3(30)
ACC	11	7(63.6)	9(81.8)	7(63.6)
ACC-PP0.85	11	8(72.7)	9(81.8)	8(72.7)

[0285] 实施例9.

[0286] 测试在补充有1.7mM $CaCl_2$、1.7mM或0.85mM ACC-PP(ACC-PP0.85)的卵裂培养基中的胚胎发育,并与未处理培养基中的发育进行比较。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表9中。

[0287] 表9.在未处理的卵裂培养基和补充有1.7mM $CaCl_2$、1.7mM或0.85mM ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较。

[0288]

	2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3	孵化/d4
Cont Q	42	30(71.4)	38(90.4)	15(35.7)
$CaCl_2$	30	16(53.3)	24(80)	13(43.3)
ACC-PP	30	23(76.6)	27(90)	12(40)
ACC-PP0.85	30	21(70)	30(100)	24(80)

[0289] 实施例10

[0290] 在本实验中将4只5个月龄的雌性小鼠安乐死。如材料和方法中描述的收集来自每只小鼠的胚胎,但是不将胚胎汇集在一起。来自每只小鼠的每条输卵管的胚胎在补充有1.7mM $CaCl_2$或1.7mM ACC-PP的卵裂培养基中生长,在培养物中单独生长。以这样的方式,我们也可以评估小鼠之间的差异,因为来自每只雌鼠的胚胎是同胞(sibling)。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表10中。

[0291] 表10.在补充有1.7mM $CaCl_2$或ACC-PP的卵裂培养基中分别生长的来自4只雌性小鼠的胚胎之间的比较。

[0292]

	$CaCl_2$	ACC-PP	$CaCl_2$	$CaCl_2$	ACC-PP	ACC-PP	$CaCl_2$	$CaCl_2$	ACC-PP	ACC-PP	$CaCl_2$	ACC-PP	$CaCl_2$	ACC-PP

[0293]

小鼠#	总胚胎	总胚胎	2细胞/d1	非正常/d1	2细胞/d1	非正常/d1	8细胞/d2	致密化/d2	8细胞/d2	致密化/d2	胚泡/d3	胚泡/d3	孵化/d4	孵化/d4
1	12	11	3	9	3	8	2	1	0	3	1 (8.3)	3 (27.3)	0 (0)	2 (18.2)
2	9	13	3	6	4	9	0	3	0	5	2 (22.2)	5 (38.5)	0 (0)	4 (30.8)
3	10	10	7	3	3	7	0	6	0	4	5 (50)	4 (40)	3 (30)	3 (30)
4	18	17	14	4	13	4	4	10	2	12	12 (66.7)	14 (82.3)	7 (41.2)	12 (70.6)

[0294] 实施例11.

[0295] 在本实验中，将7只6个月龄的雌性小鼠安乐死。如材料和方法中描述的，从每只小鼠收集胚胎，但是，没有将从1号和2号小鼠收集的胚胎汇集在一起，而是如实施例5中那样单独生长。来自1号小鼠的胚胎在未处理的卵裂培养基或补充有2.6mM ACC-PP的培养基(ACC-PP2.6)中生长。来自2号小鼠的胚胎在补充有1.3mM或0.6mM的ACC-PP的卵裂培养基(分别被标识为ACC-PP 1.3和ACC-PP 0.6)中生长。将来自3-7号小鼠的胚胎全部汇集在一起，并用1.6mM聚磷酸盐(PP)生长。此外，计算胚泡的直径和体积。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表11中。

[0296] 表11：在未处理的卵裂培养基或在补充有不同浓度ACC-PP的培养基中生长的同胞胚胎的比较。来自3-7号小鼠的汇集的胚胎在补充有聚磷酸盐的培养基中生长。

[0297]

	小鼠 1		小鼠 2		小鼠 3-7
添加剂	Cont Q	ACC-PP2.6	ACC-PP1.3	ACC-PP0.6	PP
总计#	17	19	18	13	37
8细胞/d2	7	3	7	4	9
致密化/d2	10	16	11	8	20
胚泡/d3	17 (100)	19 (100)	18 (100)	13 (100)	20 (54.1)
孵化/d4	11 (64.7)	19 (100)	17 (94.4)	6 (46.2)	17 (45.9)

[0298] 发现用2.6mM的ACC-PP生长的孵化的胚泡直径比对照大28％，且体积为对照2倍大。

[0299] 实施例12.

[0300] 在本实验中，将7只6个月龄的雌性小鼠安乐死。如材料和方法(实施例6)中描述的收集来自每只小鼠的胚胎。将胚胎汇集在一起，并且分成5组，在未处理的卵裂培养基(Cont Q)中生长，或者在补充有2.6mM、1.3mM、0.6mM ACC-PP(分别被标识为ACC-PP 2.6、ACC-PP 1.3和ACC-PP 0.6)或1.6mM聚磷酸盐(PP)的培养基中生长。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表12中。

[0301] 表12：在未处理的卵裂培养基或补充有2.6mM、1.3mM或0.6mM ACC-PP或补充有1.6mM PP的培养基中生长的胚胎的比较。

[0302]

	Cont Q	ACC-PP2.6	ACC-PP1.3	ACC-PP0.6	PP
总计#	42	20	31	21	36
8 细胞/d2	19	5	7	5	6
致密化/d2	25	15	24	16	30
胚泡/d3	35 (83.33)	20 (100)	26 (83.87)	3 (14.28)	34 (94.44)
孵化/d4	16 (38.09)	19 (95)	15 (48.38)	18 (85.7)	16 (44.44)

[0303] 实施例13.

[0304] 在本实验中,将6只6个月龄的雌性小鼠安乐死。如材料和方法中描述的收集来自每只小鼠的胚胎。将胚胎汇集在一起并且分成3组:一组用作对照(Cont Q),并且在另两组中胚胎在补充有3.3mM ACC-PP(ACC-PP3.3)或3.3mM可商购的纳米结晶碳酸钙(CCC)的卵裂培养基中生长。所有三种培养基在无菌条件下制备。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表13中。

[0305] 表13.在未处理的卵裂培养基与补充有3.3mM ACC-PP或3.3mM CCC的培养基中生长的胚胎的比较。

[0306]

	Cont Q	ACC-PP 3.3	CCC
总计#	18	45	17
8 细胞/d2	10	0	3

[0307]

致密化/d2	8	45	14
胚泡/d3	18 (100)	45 (100)	17 (100)
孵化/d4	14 (77.7)	42 (93.3)	14 (82.35)

[0308] 实施例14.

[0309] 在本实验中,将6只7个月龄的雌性小鼠安乐死。按照材料和方法(实施例6)中描述的从每只小鼠收集胚胎。将胚胎汇集在一起并且在补充有1.7mM $CaCl_2$、1.7mM ACC-PP、0.8mM ACC-PP(ACC-PP0.8)或1.7mM的磷酸丝氨酸(PS)的卵裂培养基中生长。在每个发育阶段的胚胎数和它们在最初胚胎数中的比例(在括号中)呈现在表14中。

[0310] 表14.在添加1.7mM $CaCl_2$、1.7mM ACC-PP、0.8mM ACC-PP和1.7mM的PS的卵裂培养基中生长的胚胎的比较。

[0311]

	$CaCl_2$	ACC-PP	ACC-PP 0.8	PS
总计#	11	15	14	13
8 细胞/d2	6	1	3	5
致密化/d2	5	14	11	8
胚泡/d3	10 (90.90)	14 (93.3)	14 (100)	12 (92.3)
孵化/d4	4 (36.36)	13 (86.6)	11 (78.57)	10 (76.9)

[0312] 可以看出，在该特定实验中，添加氯化钙对胚胎发育具有负面影响，导致更低的胚泡和孵化的胚泡的百分比。

[0313] 实施例15.

[0314] 在本实验中，将6只6个月龄的雌性小鼠安乐死。如材料和方法(实施例6)中描述的收集来自每只小鼠的胚胎，但是没有将来自1号和2号小鼠的胚胎汇集在一起，而是作为同胞实验单独生长(参见实施例10)。来自1号雌性的胚胎在未处理的卵裂培养基中或在补充有1.7mM纳米结晶碳酸钙(CCC)的培养基中生长。来自2号小鼠的胚胎在补充有1.7mM ACC-PP或1.7mM碳酸钠($NaCO_3$)的培养基中生长。将来自3-6号小鼠的所有胚胎汇集在一起，并在未处理的培养基或补充有1.7mM $NaCO_3$或1.7mM ACC-PP的培养基中生长。另外，计算胚泡的直径和体积(参见表15)。

[0315] 表15:对在不同地补充的卵裂培养基中生长的取自两只小鼠的同胞胚胎和汇集的胚胎的发育评估。

[0316]

	小鼠 1		小鼠 2		小鼠 3-6		
添加剂	Cont Q	CCC	ACC-PP	$NaCO_3$	Cont Q	$NaCO_3$	ACC-PP
总计#	20	24	12	16	20	10	19
8 细胞/d2	14	14	3	6	14	2	17
致密化/d2	6	6	8	8	6	7	8
退行的(degenerative)	0	1	1	2	0	1	0
早期胚泡/d3	11	8	2	14	12	0	2
胚泡/d3	9	12	9	2	8	0	17
胚泡/d4	6	5	0	0	6	0	0
孵化/d4	14 (70)	15 (62.5)	11 (91.6)	2 (12.5)	14 (70)	0 (0)	19 (100)

[0317] 可以看出，与对照或ACC-PP的添加相比，添加碳酸钠导致非常差的胚胎发育。还发现在补充有2.6mM的ACC-PP的卵裂培养基中生长的孵化的胚胎具有比对照大28％的直径，并且体积为对照2倍大。

[0318] 实施例16.配制为细胞培养基补充剂的10％TP-1％柠檬酸ACC(用10％三磷酸盐和1％柠檬酸稳定的ACC)的制备。

[0319] 将36ml的3％氯化钙溶液与4ml的0.27％柠檬酸溶液和10ml的0.5406％三磷酸盐溶液混合。然后添加40ml的1.9485％碳酸钠溶液以沉淀ACC。向ACC悬浮液中添加10ml含有0.5406％三磷酸盐的稳定溶液，产生稳定的ACC悬浮液。所得悬浮液被用作Quinn's™卵裂培养基或Quinn's™ 1-Step培养基的补充剂。添加悬浮液至ACC的最终浓度为1.7或3.4mM。或者，将悬浮液用布氏漏斗过滤，用水洗涤滤饼，并且例如在烘箱中进一步干燥滤饼。将粉末添加到卵裂培养基中至最终浓度为1.7或3.4mM。

[0320] 实施例17

[0321] 在本实验中将4只6-8周龄的雌性小鼠安乐死。如材料和方法中描述的收集来自每只小鼠的胚胎。如实施例16所述制备稳定的ACC(用10％三磷酸盐和1％柠檬酸稳定的ACC)。将来自每只雌鼠的胚胎分离，并且一部分在未处理的SAGE 1-Step™培养基中生长，并且第

二部分在补充有1.7mM ACC-PP或3.4mM ACC-PP的SAGE 1-Step™培养基中生长。从图8中可以看出，稳定的ACC的添加对胚胎发育具有积极作用，导致较高的胚泡和孵化的胚泡的百分比，尤其是在3.4mM ACC的情况下。令人惊讶地发现，在补充有稳定的ACC的卵裂培养基中生长的胚胎显示出快速的卵裂和较高的孵化率。

[0322] 实施例18.配制为细胞培养基补充剂的ACC的制备。

[0323] 制备了由不同稳定剂(制备了三磷酸盐(TP)、六偏磷酸盐(HMP)、焦磷酸盐(Pyr)、磷酸丝氨酸(PS)、依替膦酸(ET)、唑来膦酸(ZA)或亚甲膦酸(MA))稳定的ACC的组合物。在典型的程序中，将钙溶液(300ml的水、24g的氯化钙和稳定剂)和碳酸盐溶液(200ml的水和17.3g的碳酸钠)混合在一起以沉淀ACC。将稳定剂溶液(100ml的水和稳定剂;钙和稳定剂溶液中稳定剂的含量如表16中所呈现)添加到ACC悬浮液中，产生稳定的ACC悬浮液。悬浮液可以被用作补充剂。然后使用布氏漏斗过滤ACC，并且用水洗涤滤饼。将悬浮液干燥以获得粉末。粉末可以作为细胞培养基补充剂被添加，或者再悬浮在水性培养基中并作为悬浮液被添加。

[0324] 表16.不同ACC组合物中稳定剂的含量

[0325]

以下中的稳定剂:	组合物							
	1% TP	2% TP/ HMP/ Pyr	3% TP/ HMP/ Pyr	4% TP/ HMP/ Pyr	5% TP/ HMP/ Pyr/ PS/ ET/ ZA/MA	6% TP/ HMP/Pyr/ PS/	10% TP/HMP/Pyr/PS/ ET/ ZA/MA	15% TP/HMP/ Pyr/ PS
钙溶液(g)	0.12	0.24	0.36	0.48	0.6	0.72	1.2	1.8
稳定溶液(g)	0.12	0.24	0.36	0.48	0.6	0.72	1.2	1.8

[0326] 在其他实施例中，如上文描述的制备组合物，向钙溶液中加入柠檬酸，以获得最终组合物中1％的柠檬酸。悬浮液本身用作培养基补充剂。或者，进一步用水洗涤悬浮液并干燥以获得粉末。粉末可以添加到任何细胞培养基中或再悬浮在水性培养基中。

[0327] 实施例19.MBA13干细胞(骨髓基质细胞)向成骨细胞的生长

[0328] 材料和方法

[0329] 解冻后两天，将MBA-13细胞(从Weizmann Institute of Science,Dov Zipori教授处获得)重新悬浮在重组胰蛋白酶溶液中，并以1x10^{4}个细胞/孔的浓度接种在96孔板上(第“0”天)，使用以50ml:300μl的比率补充有间充质干细胞(Mesenchymal stem cell,MSC)补充剂混合培养基(Biological Industries cat#05-201-06)的MSC Nutristem® XF基础培养基(Biological Industries,cat#05-200-1A)。将96平板的第1-4列的A-H行以在PBS(不含Ca^{2+}、Mg^{2+})中以1:100的比率稀释的MCS附着溶液预涂覆用于细胞接种。96板的第5-8列的A-H行在室温用明胶0.1％预涂覆持续30分钟。

[0330] 在第2天，当达到80％以上的细胞汇合时(～48h)，培养基更换为含有推动成骨细胞分化的因子的MSCgo快速成骨培养基(cat#05-442-1B)。在培养基更换后，A-C行被另外的1mM钙所补充(总共2.488mM钙)，该另外的钙来源于由10％三磷酸盐+1％柠檬酸稳定的无定形碳酸钙(ACC);D-F行被另外的来源于氯化钙的1mM钙所补充(总共2.488mM钙);用MSCgo培

养基(总共1.488mM钙)处理板中的G行。用MSC NutriStem® XF营养基础培养基+补充混合物(总共1.488mM钙)处理板的H行。

[0331] 在第4天,用ACC的新鲜制剂交换培养基。

[0332] 平行地,也用来源于MDX小鼠的受损肌肉的MDX细胞系在对照板上接种。这些细胞的染色被用于设置细胞固有钙的背景染色,并且也被用于消除ACC处理的钙沉积被染色的可能性。接种前,用明胶涂覆孔,其用作MDX细胞附着的标准基质。将MDX细胞以3×10^4个细胞/孔的浓度接种在24孔板上。接种日被定义为"第0天"。

[0333] 在第2天,用以下物质替换孔中的培养基:

[0334] 第1和2列用内部制备的脊髓(SC)培养基处理(该培养基包含0.6wt%D-葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺、庆大霉素25μg/ml、B27、N_2、BSA 0.1mg/ml、Hepes、10%FBS、DMEM/F12和IGF-I,50ng/ml)+来源于ACC的1mM钙(2mM的总钙浓度);第3和4列用SC培养基+1mM来源于$CaCl_2$的钙处理;第5和6列用SC培养基处理。两种类型的细胞(MBA13和MDX)均培养多达10天。

[0335] 在培养基交换后的第5天、第7天和第10天,即研究的第7天、第9天和第12天,对每种类型的几个孔进行固定(用4%多聚甲醛持续20分钟)。

[0336] 一旦细胞被固定,两种染色试剂被用于染色细胞外钙或骨沉积,以评估成骨细胞功能:(i)茜素红(Alizarin red)(Sigma A55333)和(ii)碱性磷酸酶(DAKO BCIP/NBT底物系统K0598),如下所示:

[0337] 茜素红染色程序-pH调节至4.2。用PBS洗涤细胞两次,并且用冷甲醇固定持续5分钟,并且然后用PBS再次洗涤。使用以2%的浓度的茜素溶液持续15-20分钟。染色孵育后,用水洗涤样品2-3次,以去除非特异性染色。

[0338] 碱性磷酸酶染色-用PBS洗涤细胞1或2次,并且然后用4%多聚甲醛固定持续20分钟。然后,用PBS洗涤3次,并且移除PBS残余物后,用3滴BCIP/NBT试剂盒溶液覆盖细胞,包括一个没有任何细胞的空孔作为对照,以定量测定。碱性磷酸酶试剂盒孵育进行持续1小时,并且然后用蒸馏水冲洗。

[0339] 结果

[0340] 提供了培养持续10天并用茜素和碱性磷酸酶两者染色的细胞的结果。10天前进行的观察在两种染色方法中几乎没有检测到任何钙沉积。

[0341] 在光学显微镜下(不固定)在第2天和第4天两个时间点观察细胞状况。在两次观察中,接种在预先涂覆有MSC附着溶液的孔上的细胞状况不佳;细胞变圆(rounded)。与之相比,接种在预先涂覆有明胶的孔上的细胞状况良好。尽管如此,决定继续进行这两种类型的预涂覆。以下结果和染色程序是涉及在用于作为附着基质的明胶中生长的细胞。

[0342] 在茜素红染色中,钙沉积根据橙红色被检测到。

[0343] 茜素红染色展示了与仅展示微弱信号的补充有$CaCl_2$的那些样品相比,补充有ACC的成骨细胞样品中非常强的信号(图9)。除了信号之外,在图中可以看出,大的钙沉积斑块被染色,这在任何对照处理中都没有观察到。

[0344] 在MSCgo快速培养基中生长的细胞的茜素红染色也展示出一些钙沉积染色,但是沉积的大小和其数量显著较低,并且类似于对于在补充有$CaCl_2$的细胞观察到的形态和数量。在MSC NutriStem+补充剂(MSC sup;数据未示出)中生长的细胞没有观察到钙沉积。MSC

NutriStem+sup培养基通常用于诱导细胞增殖而不是分化。实际上，观察到的细胞数量大，但没有观察到钙沉积。

[0345] 这一观察结果表明，ACC处理促进了MBA13细胞向成骨细胞的分化，并提高了细胞钙沉积，即促进了它们的功能。

[0346] 成骨细胞分化的另一个独立标志物是碱性磷酸酶。当细胞的基质成熟期出现时，这种酶最大化地表达。碱性磷酸酶染色被用于作为检测成骨细胞分化和功能的补充方法，以验证由茜素染色获得的结果。

[0347] 碱性磷酸酶染色以黑色示出，并且结果呈现在图10中。与其他处理相比，用ACC处理的MBA13细胞展示出强烈的信号。事实上，碱性磷酸酶染色支持了在用ACC处理的培养物中成骨细胞分化得更好。

[0348] 接种后10天用富含ACC的培养基处理的MDX细胞的茜素染色展示，各处理之间的染色没有大的差异(见图11A-C)。这些结果支持，成骨细胞的茜素红染色是由于通过成骨细胞的钙沉积，而不是由于由治疗本身引起的ACC沉积(即，它不是实验假象)。

[0349] MDX细胞系的碱性磷酸酶染色(图11D-E)展示了没有骨形成发生。有趣的是，在碱性磷酸酶染色中，与在补充有$CaCl_2$的培养基或对照中生长的细胞相比，在ACC处理的细胞中观察到增强的肌管形成。

[0350] 结论

[0351] 在不同培养基中接种10天后的两种独立染色，即茜素红和碱性磷酸酶示出了，与使用的对照相比，在补充有ACC的培养基中生长的成骨细胞沉积的染色显著更强。

[0352] 当细胞在ACC存在下生长时观察到大的钙沉积斑块，对于在补充有$CaCl_2$的培养基中生长的细胞，没有观察到这样的沉积。较强的信号可能表明较大的功能，因为染色展示更多的斑块沉积。由MDX细胞染色获得的结果表明，斑块不是来源于ACC的添加，而是成骨细胞功能的直接结果。

[0353] 实施例20-用于促进精子运动性的ACC

[0354] 材料和方法

[0355] ACC悬浮液制备

[0356] 将36ml的3％氯化钙溶液与4ml的0.3％柠檬酸溶液和10ml的0.5％三磷酸盐溶液混合。然后添加40ml的2％碳酸钠溶液以沉淀ACC。向ACC悬浮液中添加10ml含有0.5％三磷酸盐的稳定溶液，产生稳定的ACC悬浮液。所获得的悬浮液的元素钙浓度为75mM。

[0357] 精子收集

[0358] 从同一只公羊收集了3次精子(实验1)或从3只公羊收集2次(实验2&3)并且在室温评估浓度和运动性。在合成输卵管液(SOF)中将精子稀释至5000万个精子/ml的浓度，所述合成输卵管液包括：在Milli-Q水中107.70mM NaCl、7.16mM KCl、1.19mM KH_2PO_4、1.71mM $CaCl_2$、0.49mM $MgCl_2$、25.07mM $NaHCO_3$、3.30mM乳酸钠和1.50mM葡萄糖(10)。同渗容摩应为270mOsmol，且pH为7.55。

[0359] 然后使用CASA(The riogenology，2014，第81卷，第1期，第5-17页)评估精子的运动性，并以1℃/min冷却至4℃。

[0360] 上游程序

[0361] 在38℃进行上游程序，将原始精子(10ul)置于eppendorf 1ml小瓶中，并在插入

0.25ml吸管(CBS,法国)的SOF培养基中孵育持续约1小时。40-60分钟后,将进入吸管的精子放在载玻片上,并由CASA评估。

[0362] 结果

[0363] 在添加或不添加无定形碳酸钙的情况下,如在材料和方法部分中所描述的,测试新鲜收集的精子的运动性。在表17中呈现了结果。

[0364] 表17.添加和不添加ACC悬浮液34μl/ml(2.6mM元素Ca)的精子的运动性评估。

[0365]

	%运动性	%前向运动性
对照	96±1.15	55.3±1.15
ACC(34μl/ml:2.6mM元素Ca)	95±1	70.6±3.2

[0366] 可以看出,补充有ACC的精子比未处理的精子具有高得多的前向运动性。

[0367] 实施例21.在上游实验(swim up experiment)中ACC对精子运动性的影响

[0368] 为了评估ACC对精子运动性的影响,在17μl/ml和34μl/ml ACC悬浮液(分别为1.3mM和2.6mM元素Ca)的存在下进行了标准的上游实验。1小时后计数有活力的精虫,并且结果总结在表18中。

[0369] 表18:上游实验中ACC对精子运动性的影响(浓度以百万/ml计)

[0370]

ACC 浓度 (元素钙浓度)	精子浓度(x10^6/ml)		
	实验 1	实验 2	实验 3
对照	142±7.3	97±15	207±12
ACC 17 μl/ml (1.3 mM 元素 Ca)	523±5.7	186±14	
ACC 34 μl/ml 1.3 mM 元素 Ca)			1463±400

[0371] 可以清楚地看出,在所有实验中,ACC的添加显著增加了有活力的精虫的数量。在补充有ACC的样品中,有活力的精虫的数量是未处理样品的2至7倍高。

[0372] 实施例22.上游实验中ACC浓度对精子运动性的影响

[0373] ACC浓度对精子运动性的影响通过上游实验来测试,对于每个ACC浓度使用3种不同的样品。结果总结在表19中。

[0374] 表19.上游实验中ACC浓度对精子运动性的影响(浓度以百万/ml计)

[0375]

ACC 浓度 (元素钙浓度)	精子浓度(x10^6)
对照	45.5
ACC 8 μl/ml (0.6 mM 元素 Ca)	102、77、89
ACC 17 μl/ml (1.3 mM 元素 Ca)	179、170、174
ACC 34 μl/ml (2.6 mM 元素 Ca)	196、200、198
ACC 60 μl/ml (4.6 mM 元素 Ca)	182、205、193

[0376] 已经注意到,在合成的输卵管液(SOF)溶液中添加17μl/ml ACC悬浮液并在38℃持续1小时的孵育,使运动精子(motile sperm)的浓度增加至少3倍。有趣的是,较高浓度的ACC并没有降低上游后运动精子的浓度。结论是,ACC在上游程序后增加了精子浓度,并且对

于离子钙无任何双相作用。任何高于最小有效剂量的ACC浓度增强运动性。

[0377] 实施例23.ACC在体外保存卵巢

[0378] 材料和方法

[0379] 卵巢从小鼠(6周龄)收集，切割成0.4mm×0.4mm碎片。将卵巢在12孔板中培养。培养基包括:90％Dulbecco氏改良的eagle培养基-营养混合物F-12(DMEM-F12)脱钙的(无钙离子的培养基，特定制剂)，10％胎牛血清(FBS)，2mM谷氨酰胺，25μg/mL庆大霉素和0.3-0.5％NVR-Gel，具有或不具有稳定的3.4mM ACC-PP。培养48h后，将5IU的妊娠母马的血清促性腺激素(PMSG)添加到培养皿中。

[0380] 结果

[0381] 从图12可以看出，在稳定的ACC存在下，体外培养2周后，次级卵泡发育，并且卵母细胞周围的颗粒细胞完整。与之相比，对照组的次级卵泡示出不完整的颗粒细胞和生发泡卵母细胞(Germinal vesicles oocyte)。在ACC组中观察到多得多的卵泡，意味着在培养基中添加ACC允许卵泡更快且更好的生长，以及改进的卵巢保存。

[0382] 尽管在上文中已经通过本发明的优选实施方案描述了本发明，但是在不脱离如所附权利要求中限定的本发明的精神和性质的情况下，可以对本发明进行修改。

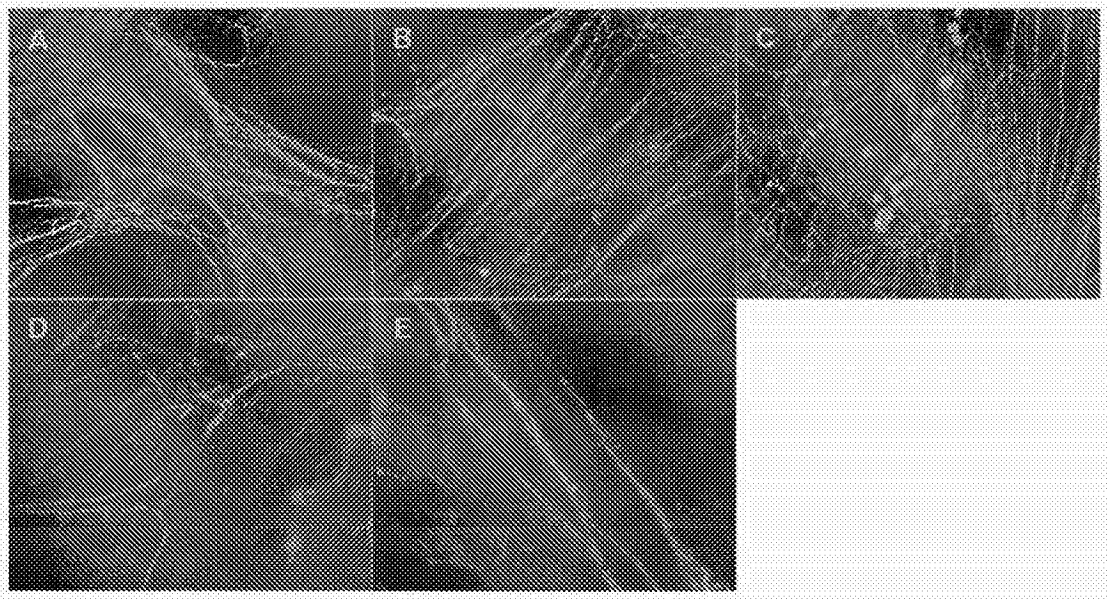

图1

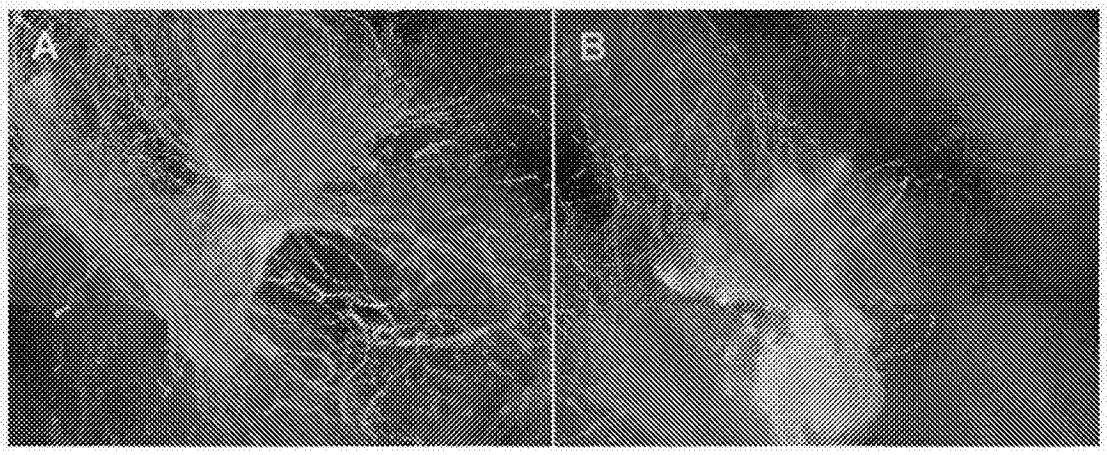

图2

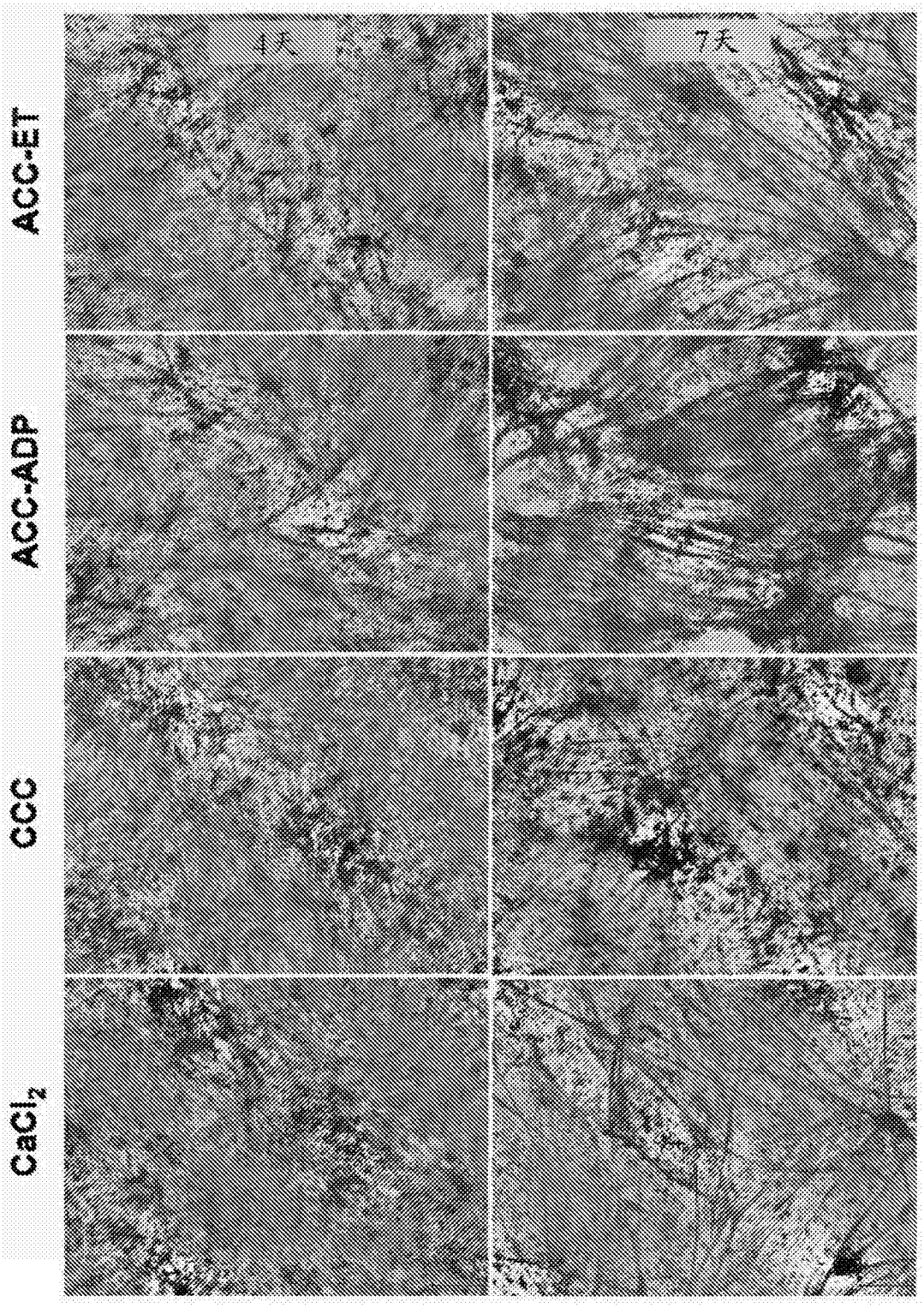

图3

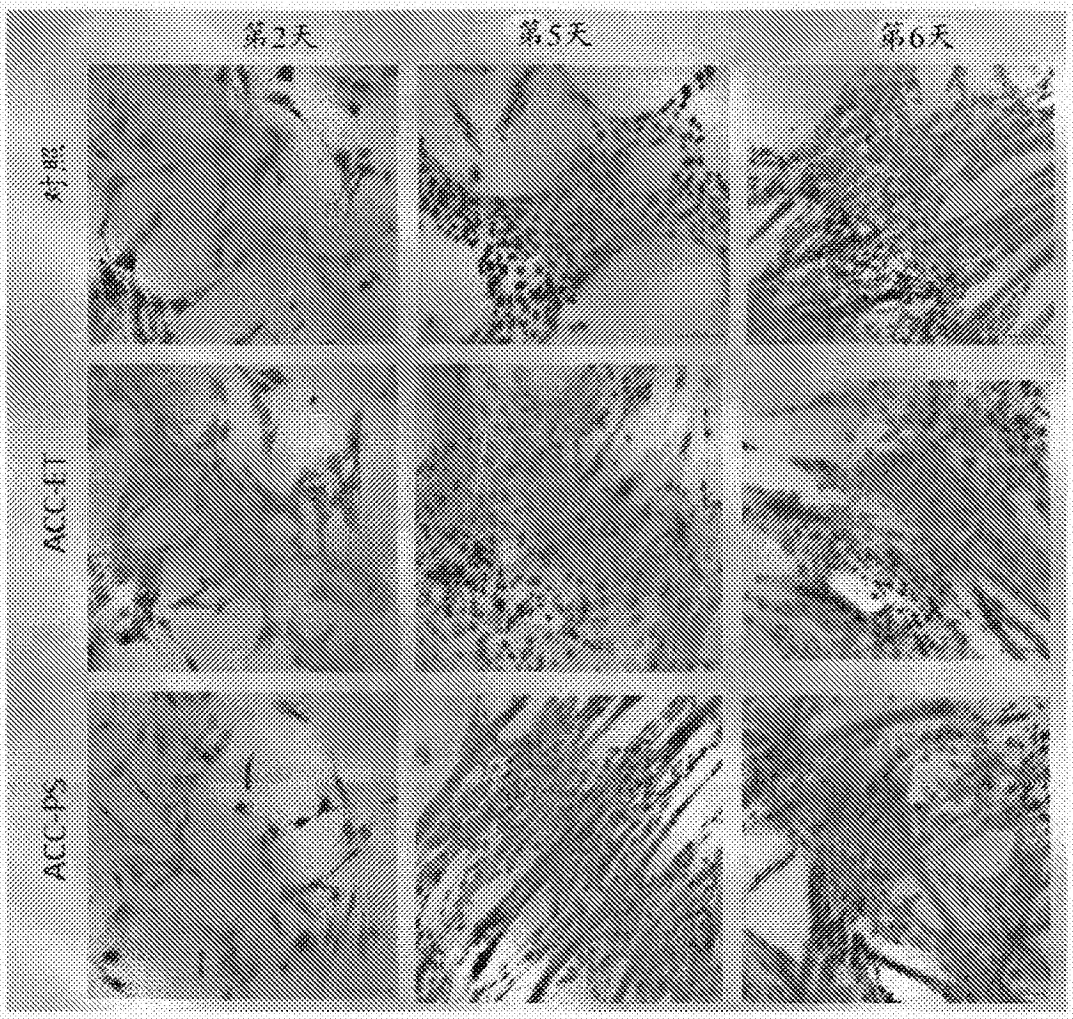
第2天
第5天
第6天
对照
ACC-ET
ACC-PS

图4

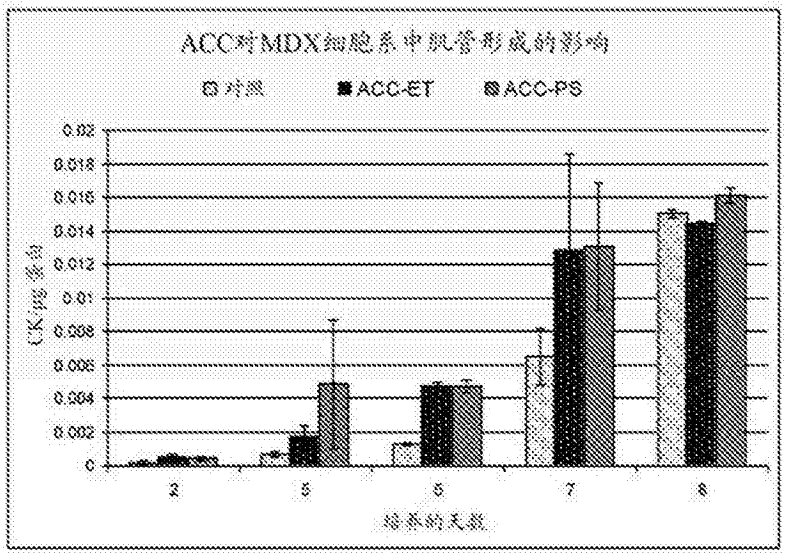
ACC对MDX细胞系中肌管形成的影响
对照
ACC-ET
ACC-PS
0.02
0.018
0.016
0.014
0.012
0.01
0.008
0.006
0.004
0.002
0
2
5
6
7
8

图5

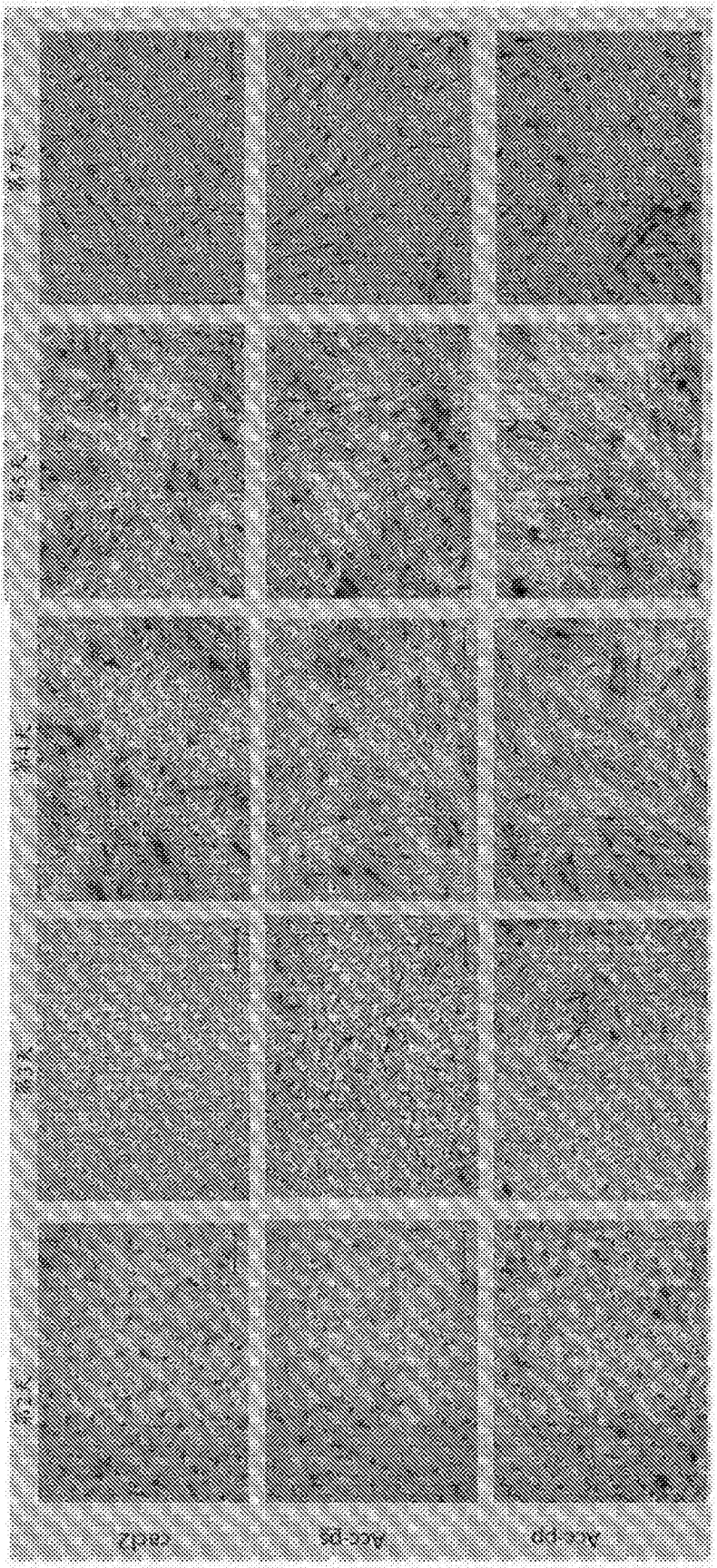
对照
实施例1
实施例2
实施例3
实施例4
实施例5
实施例6
实施例7
实施例8
实施例9
实施例10
实施例11
实施例12
实施例13
实施例14
实施例15
实施例16
实施例17
实施例18
实施例19
实施例20
实施例21
实施例22
实施例23
实施例24
实施例25
实施例26
实施例27
实施例28
实施例29
实施例30
实施例31
实施例32
实施例33
实施例34
实施例35
实施例36
实施例37
实施例38
实施例39
实施例40
实施例41
实施例42
实施例43
实施例44
实施例45
实施例46
实施例47
实施例48
实施例49
实施例50
实施例51
实施例52
实施例53
实施例54
实施例55
实施例56
实施例57
实施例58
实施例59
实施例60
实施例61
实施例62
实施例63
实施例64

图6

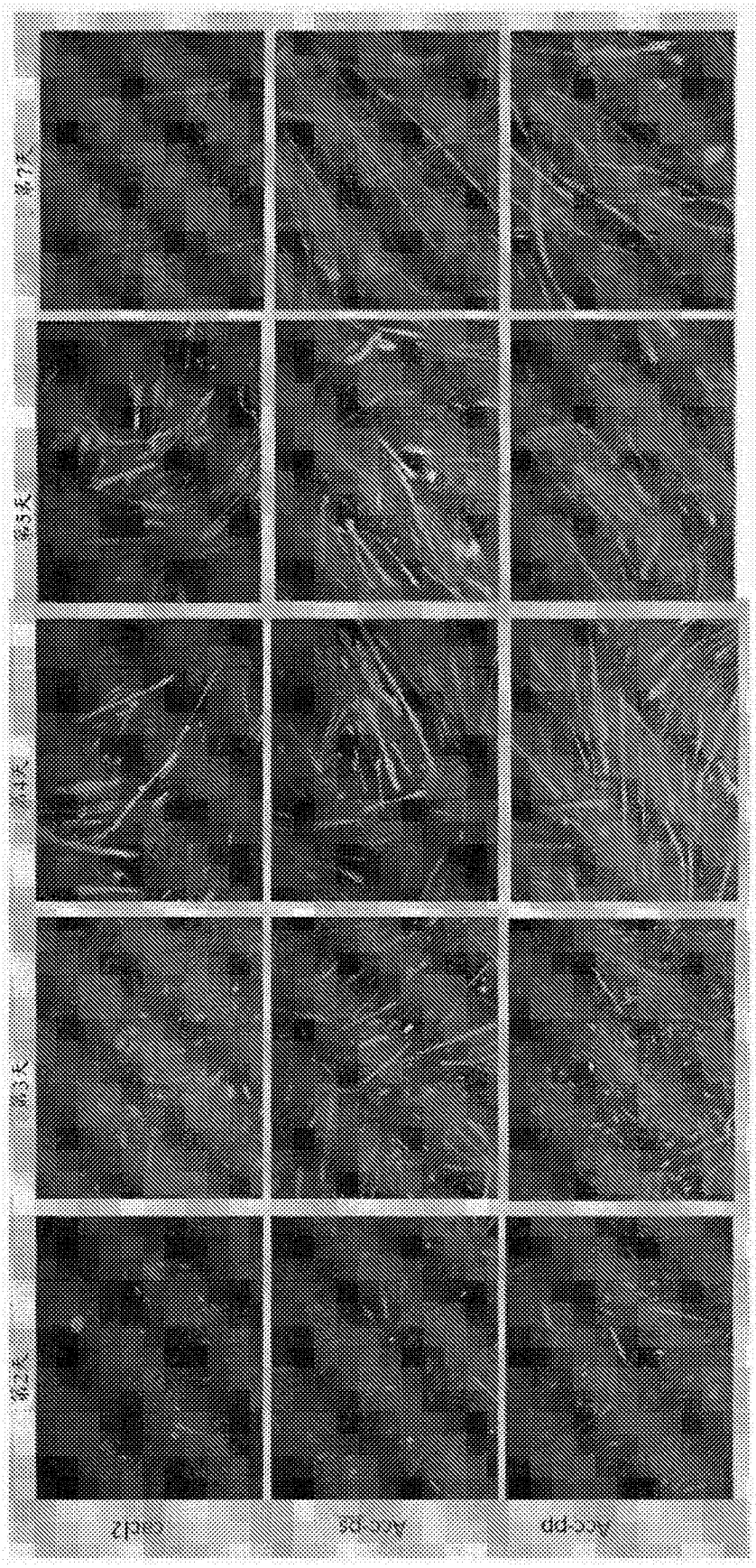

图7

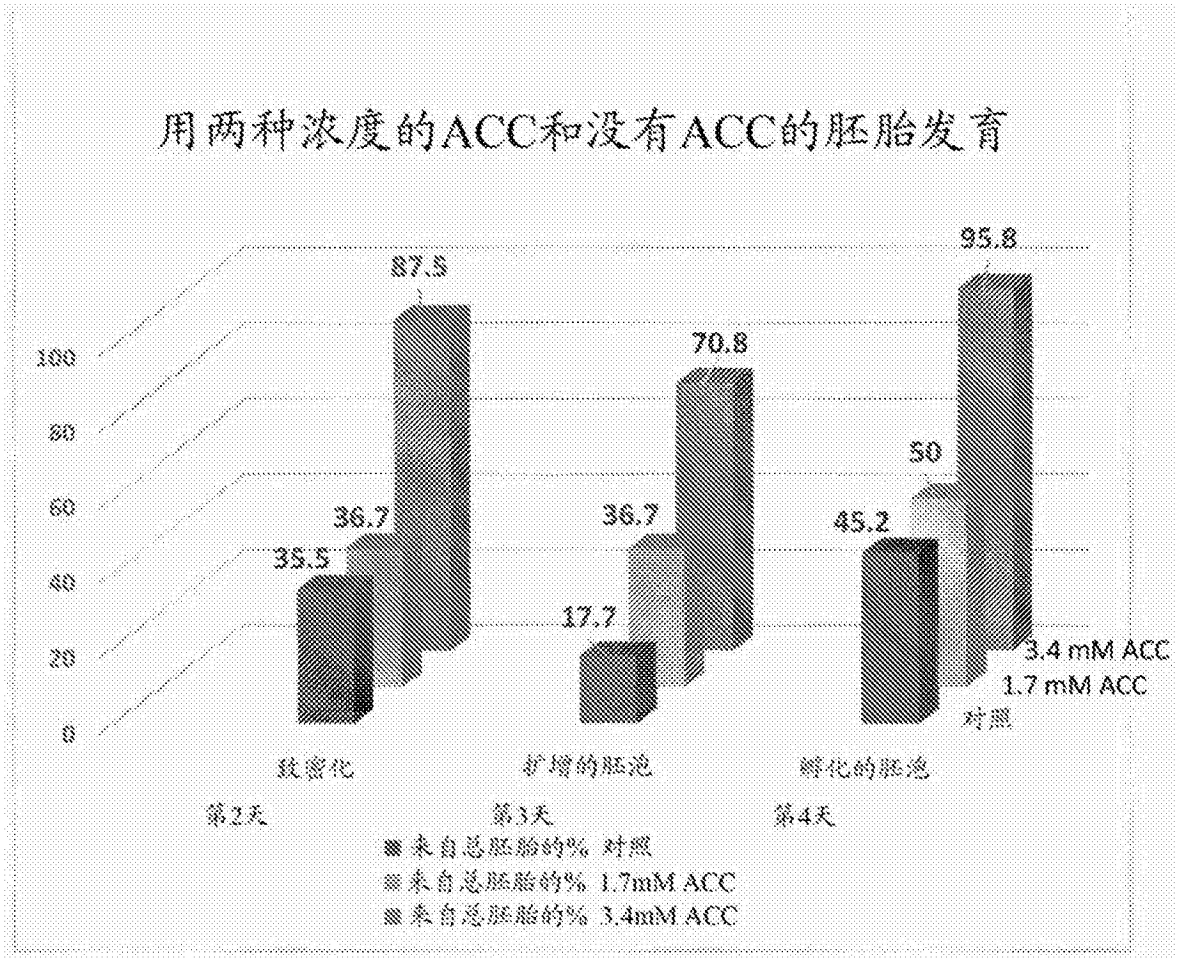
用两种浓度的ACC和没有ACC的胚胎发育
100
80
60
40
20
0
87.5
36.7
35.5
70.8
36.7
17.7
95.8
50
45.2
3.4 mM ACC
1.7 mM ACC
对照
致密化
扩增的胚泡
孵化的胚泡
第2天
第3天
第4天
来自总胚胎的% 对照
来自总胚胎的% 1.7mM ACC
来自总胚胎的% 3.4mM ACC

图8

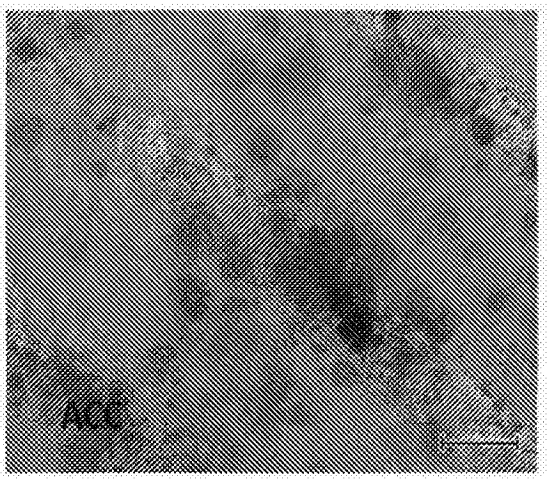
ACC

图9A

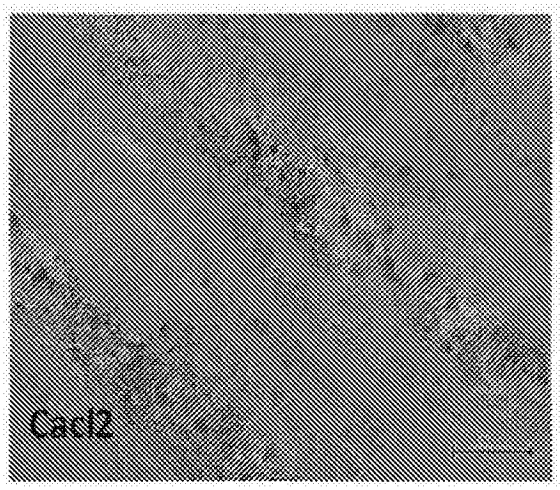

图9B

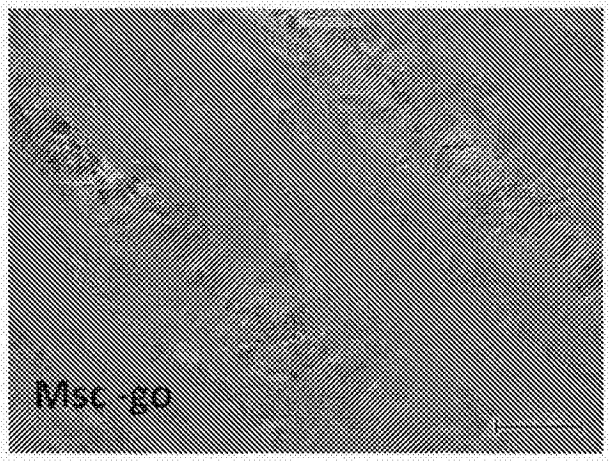

图9C

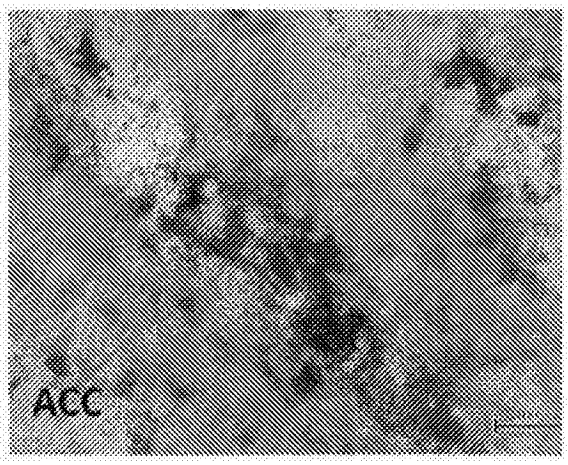

图10A

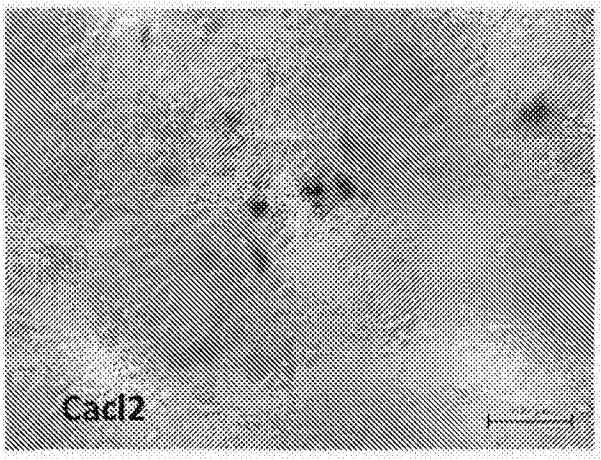

图10B

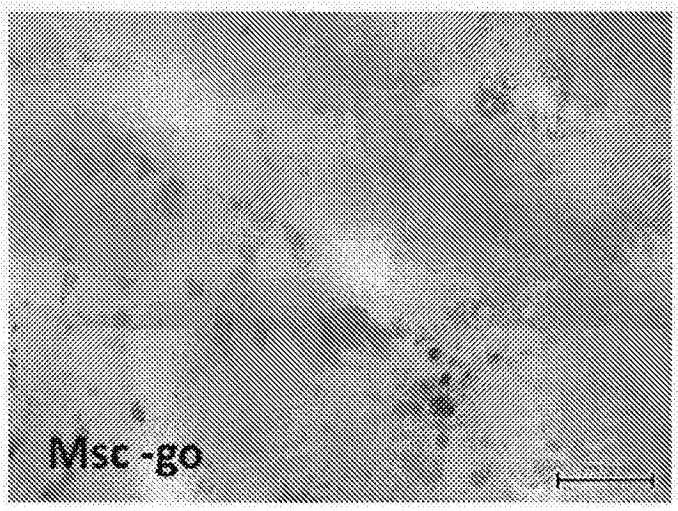

图10C

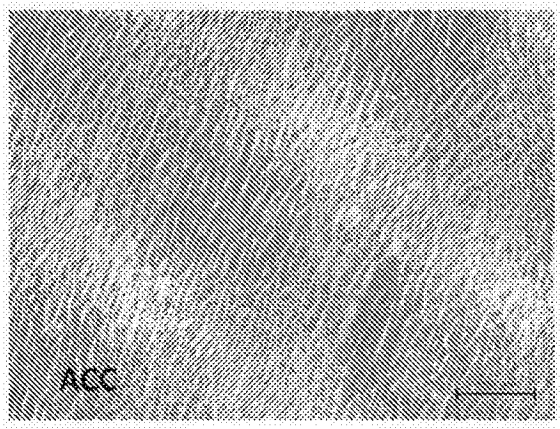

图11A

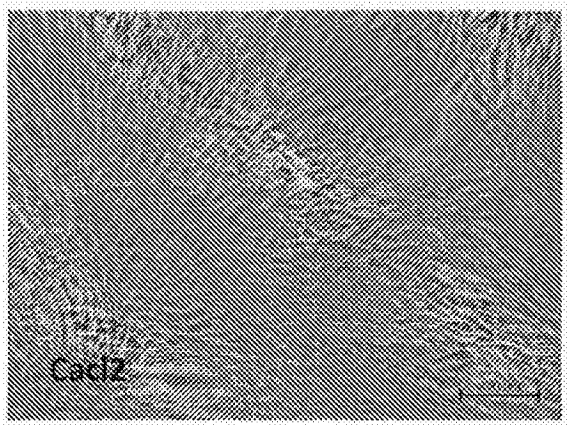

图11B

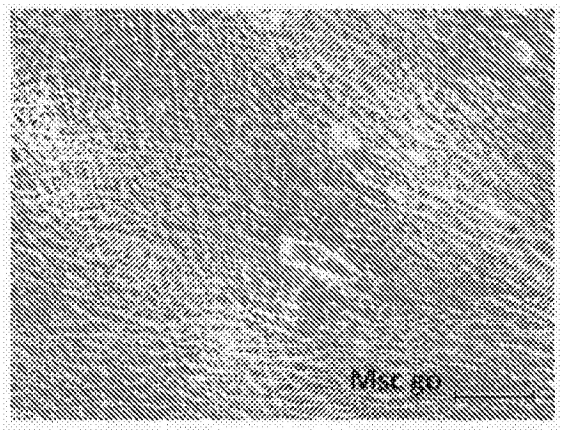

图11C

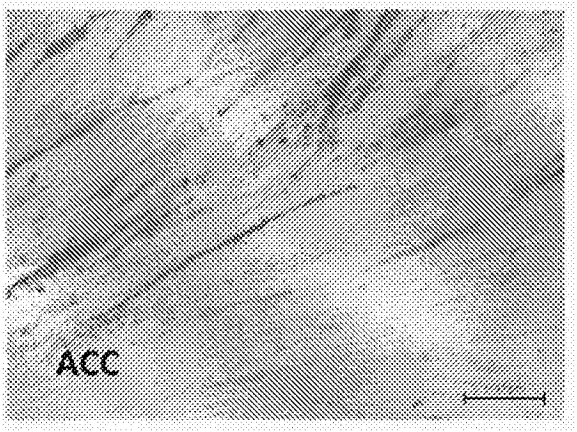

图11D

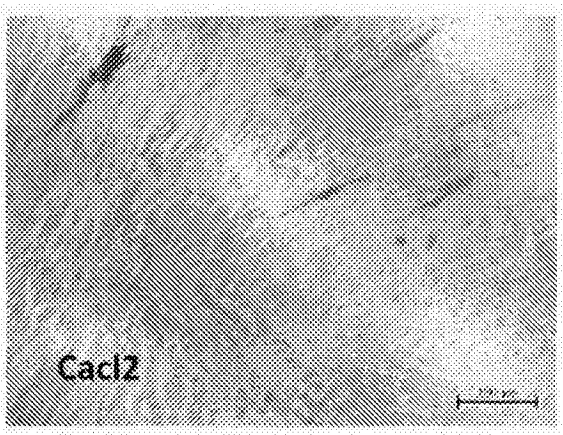

图11E

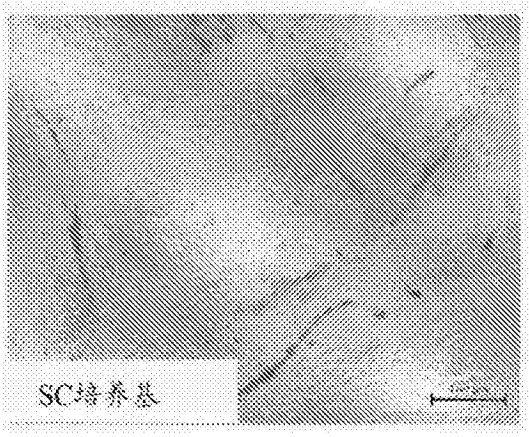

图11F

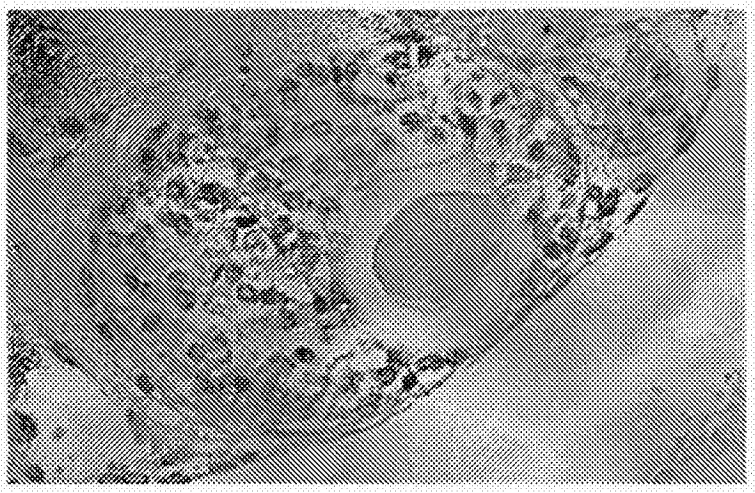

图12A

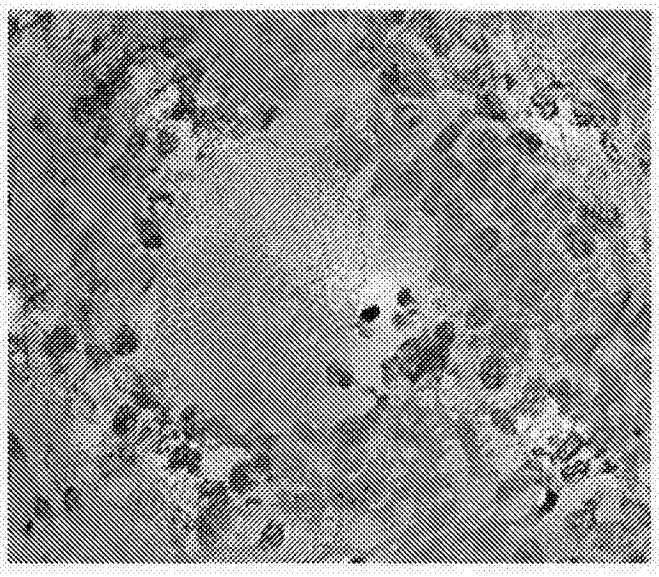

图12B