



(21) 申请号 202410801920.7

(22) 申请日 2017.01.17

(30) 优先权数据

62/279,844 2016.01.18 US

62/279,845 2016.01.18 US

62/279,843 2016.01.18 US

62/376,428 2016.08.18 US

(62) 分案原申请数据

201780018159.8 2017.01.17

(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

专利代理人 卓晓曦 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 33/10 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C12N 5/076 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/075 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

权利要求书2页 说明书41页 附图13页

(54) 发明名称

治疗神经、肌肉和不育疾病或状况的稳定的无定形碳酸钙

(57) 摘要

本申请涉及治疗神经、肌肉和不育疾病或状况的稳定的无定形碳酸钙。提供了用于多种神经、肌肉和不育疾病和状况的治疗的稳定的无定形碳酸钙(ACC)。特别地,稳定的ACC可以用于在轴突缺陷和肌营养不良症的治疗中使用。此外,提供了在辅助生殖技术中使用的改进的方法。这样的方法的实例是体外受精和精子质量的改进。改进的IVF方法,例如,包括向受精和胚胎发育阶段发生在其中的细胞培养基添加稳定的ACC。

1. 由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 在制备用于治疗轴突创伤性损伤的药物中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中治疗创伤性损伤包括促进受损神经的再生。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述损伤是中枢神经系统的神经的损伤或外周神经系统的神经的损伤。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用途, 其中所述至少一种稳定剂选自聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化的肽、羧基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、糖类及其任意组合。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其中所述至少一种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、几丁质及其任意组合。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述药物通过全身施用被施用。

7. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述药物被局部施用。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述ACC在损伤的神经附近被施用。

9. 由至少一种稳定剂稳定的ACC在制备用于体外受精的组合物或细胞培养基中的用途, 其中所述体外受精包括 (a) 使哺乳动物卵母细胞体外受精; 和 (b) 体外培养胚胎, 其中步骤 (a)、步骤 (b) 或步骤 (a) 和 (b) 两者在细胞培养基或包含所述组合物的细胞培养基中进行。

10. 根据权利要求9所述的用途, 其中所述体外受精包括在细胞培养基或包含所述组合物的细胞培养基中体外培养所述胚胎, 从而促进胚胎发育。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述体外受精还包括在步骤 (a) 之前, 在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中卵母细胞的体外成熟的步骤。

12. 由至少一种稳定剂稳定的ACC在制备用于改进精子质量的组合物或细胞培养基中的用途, 其中所述改进精子质量包括将精子暴露于所述培养基或所述组合物。

13. 根据权利要求12所述的用途, 其中改进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、增加精子计数及其任意组合。

14. 根据权利要求13所述的用途, 其中增加精子计数包括在进行运动性或前向运动性程序后增加精子计数。

15. 根据权利要求9至14中任一项所述的用途, 其中所述精子、卵母细胞或胚胎是人或非人哺乳动物的精子、卵母细胞或胚胎。

16. 根据权利要求15所述的用途, 其中所述非人哺乳动物选自由家畜动物、家养宠物、啮齿类动物和灵长类动物组成的组。

17. 根据权利要求15所述的用途, 其中所述精子、卵母细胞或胚胎是人的精子、卵母细胞或胚胎。

18. 根据权利要求9至14中任一项所述的用途, 其中所述至少一种稳定剂选自聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化的肽、羧基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、糖类及其任意组合。

19. 根据权利要求18所述的用途, 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、几丁质及其任意组合。

20. 由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙 (ACC) 在制备用于治疗雄性不育的药物中的用途。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述雄性不育选自由低精子计数、低精子运动性和低精子前向运动性造成的雄性不育。

22. 根据权利要求21所述的用途,其中所述至少一种稳定剂选自聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化的肽、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、糖类以及它们的任意组合。

23. 根据权利要求22所述的用途,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、几丁质及其任意组合。

## 治疗神经、肌肉和不育疾病或状况的稳定的无定形碳酸钙

[0001] 本申请是申请日为2017年1月17日,申请号为201780018159.8,发明名称为“治疗神经、肌肉和不育疾病或状况的稳定的无定形碳酸钙”的申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明提供了用于某些肌肉、神经和不育疾病或状况的治疗的稳定的无定形碳酸钙(ACC)。此外,稳定的ACC可以在不同的辅助生殖技术中使用,例如用于促进哺乳动物胚胎生长或用于精子质量的改进。

### 发明背景

[0004] 在临床前和临床生物利用度模型中已经示出了,ACC的施用导致了钙生物利用度的促进(Meiron等人,J Bone Miner Res.2011,26(2):364-72,Shaltiel等人,Health 5, 2013,18-29,和Vaisman等人,Journal of Bone and Mineral Research,2014,29(10),pp 2203-2209),这是一种在缓解钙吸收不良相关状况和紊乱方面特别重要的作用。ACC的口服施用导致了骨参数的积极影响,这由在骨质疏松预防模型中的抗再吸收行为、合成代谢作用和骨机械强度的维持所展示(Shaltiel等人)。WO 2013/088440公开了无定形碳酸钙组合物,用于在治疗钙吸收不良和吸收不良相关的紊乱、疾病和状况中使用,以及用于在钙吸收不良和骨代谢相关紊乱中增加骨矿物质密度中使用。

[0005] WO 2005/115414描述了包含稳定ACC的口服可施用的组合物以及用于治疗骨质疏松、骨软化和相关疾病的方法。WO 2008/041236描述了含有无定形或微晶碳酸钙的制剂,其在治疗各种病理状况,包括增殖性疾病、神经紊乱和肌肉骨骼紊乱中是有效的。WO 2009/053967描述了含有无定形碳酸钙(ACC)以及至少一种磷酸化的氨基酸或磷酸化的肽的组合物。所述组合物可以被用于其中列出的各种疾病的治疗。

[0006] 神经损伤在临床实践中是常见的。存在许多实例,其中由事故或类似情况引起的外周神经损害不能完全恢复。还存在许多临床实例,其中作为外科手术的结果,外周神经一般必须被摘除。尽管中枢神经系统(CNS)具有神经纤维的长且弱的自我修复,外周神经系统(PNS)具有通过快速神经纤维再生修复神经的能力。关于损伤后PNS功能性恢复的研究已经成为一个快速发展的领域,致力于寻找用于帮助和引导轴突再生的合适方法。

[0007] 已经开发了各种手段来尝试再生损伤的外周神经。一种这样的技术涉及切断的神经(severed nerve)的近端和远端的实际缝合。已经积极地追求了用于引导切断的再生的轴突、缝合在近端和远端神经残端之间的各种导管的使用。

[0008] 目前缺少充分治疗的另外的疾病涉及肌营养不良症。肌营养不良症是一组削弱肌肉骨骼系统并妨碍运动(locomotion)的肌肉疾病。肌营养不良症以进行性骨骼肌无力、肌肉蛋白缺陷以及肌肉细胞和组织的死亡为特征。这样的疾病的一种是杜氏肌营养不良症(DMD),一种致命的肌肉萎缩疾病(muscle wasting disease),影响大约3500个男孩中的一个。杜氏男孩具有约20年的有限预期寿命。该紊乱由在肌萎缩蛋白基因中的突变造成;许多不同的突变已经被鉴定为导致蛋白肌萎缩蛋白的功能失调(dysfunction)。它以进行性骨

骨骼肌萎缩及退行为特征 (Shin等人 *Int J Biochem Cell Biol.* 2013, 45(10) : 2266-79), 其也涉及非正常的钙内稳态。肌营养不良症的医学管理已经包括了皮质类固醇的使用; 然而, 尽管皮质类固醇具有相当的有益效果, 长期使用皮质类固醇的治疗可导致骨质疏松。即使没有皮质类固醇, 杜氏肌营养不良症也会导致降低的行动能力, 这本身与增加的骨折几率和降低的骨矿物质密度相关 (Nanette等人, *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2012, 23(4) : 773-99)。

[0009] 目前, 对于DMD或神经损伤还不存在令人满意的治疗, 并且减轻症状的严重程度以及改进患有这些状况的生活质量可以被认为是一种成就。

[0010] 辅助生殖技术 (ART) 领域旨在解决雄性和雌性两者的不育问题。主要技术中的一种是体外受精 (IVF)。细胞培养基的内含物可显著地影响受精和胚胎发育, 并且因此从而影响该程序的结果。IVF的成功率主要与转移的胚胎数和因素例如胚胎质量相关。更换培养基可显著地影响体外胚胎发育。由于提高胚胎质量和达到高级 (advanced) 发育阶段的胚胎数量可增加成功受孕的几率, 寻找用于体外胚胎发育的最佳条件可以提高整个IVF过程的效率。

[0011] “雄性因素”不育被视为是在两个相隔1周和4周收集的精子分析物中的至少一个样品中精子浓度和/或运动性和/或形态的改变。在人中, 它占不育的40-50%, 并且影响所有男性的大约7%。雄性不育通常是由于由低精子计数、运动性和精子的非正常形态所反映的在精液或精液质量方面的不足 (Kumar和Singh, 2015, *J. Hum. Reprod. Sci.*, 8(4) : 191-196)。

[0012] 大多数ART技术, 例如宫腔内人工授精或常规IVF要求精子至少正常的运动性。目前存在多种用于精子选择的方法, 例如, 典型的洗涤上游 (swim-up) 技术被用以基于自然精子运动性来选择最活跃的细胞。被选择的精子可以从而被使用在IVF程序中。无数用于体外精子改善的技术被建议。体外实验的结果表明, 维生素E可以保护精虫 (spermatozoa) 免受氧化损伤和运动性的丧失, 并在仓鼠卵细胞穿透测定中促进精子的表现 (Agarwal&Sekhon, *Human Fertility*, December 2010, 13(4) : 217-225)。Bhoumik等人 (*Cell Biochem. Biophys.*, 2014, 70: 1177-1183) 展示了,  $Ca^{2+}$  离子向无钙培养基的添加增加精子向前运动性高达20%。

[0013] 世界范围内雄性不育的现象正在增加 (Kumar和Singh), 越来越多的夫妇转向辅助生殖技术。因此, 需要用于改进精子体外运动性的新方法。

## 发明概述

[0015] 已经令人惊讶地发现, 无定形碳酸钙 (ACC) 可以积极地促进细胞的再生、发育、成熟和分化。本发明部分地基于出乎意料的发现, 即ACC加速神经纤维再生、推动肌管形成、改善精子质量并促进胚胎发育, 包括但不限于增加达到高级发育阶段的胚胎数量。

[0016] 在一方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙 (ACC), 用于在治疗与神经肌肉缺陷相关的疾病或状况中使用。根据特定的实施方案, 疾病或状况选自肌营养不良症和轴突缺陷。根据一些实施方案, 药物组合物用于在治疗轴突缺陷, 例如轴突损害中使用。根据另一个实施方案, 药物组合物用于在治疗肌营养不良症, 例如杜氏肌营养不良症中使用。根据另外的方面, 本发明提供了用于在有相应需要的受

试者中治疗选自肌营养不良症和轴突缺陷的疾病或状况的方法,包括向所述受试者施用包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的药学上可接受的组合物。

[0017] 根据另一方面,本发明提供了用于体外受精的方法,包括(a)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(b)体外培养胚胎,其中步骤(a)、步骤(b)或步骤(a)和(b)两者在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行。在一些实施方案中,该方法可以进一步包括在步骤(a)之前,在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中卵母细胞的体外成熟的步骤。根据一些实施方案,哺乳动物选自人和非人哺乳动物。

[0018] 根据某些方面,本发明提供了用于改进或改善精子质量的方法,包括将精子暴露于由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)。根据一些实施方案,该方法包括将精子暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC或使精子与由至少一种稳定剂稳定的ACC接触。根据一个实施方案,精子是人精子。根据另一个实施方案,改进精子质量包括促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数,因此,本发明的方法包括促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数。

[0019] 根据另一个实施方案,本发明提供了用于分离携带X染色体和Y染色体的精子细胞的方法,所述方法包括:(a)使精子样品与由至少一种稳定剂稳定的ACC接触,(b)进行上游程序,(c)获得包含活动精子(motile sperm)的级分,以及(d)分离步骤(c)中获得的级分的上相和下相,其中所述上相富集有携带Y染色体的精子,并且所述下相富集有携带X染色体的精子。

[0020] 根据又另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),用于在治疗雄性不育中使用。

[0021] 根据一些方面,本发明提供了用于在有相应需要的受试者中治疗雄性不育的方法,包括向所述受试者施用包含有效量的由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的药物组合物。

[0022] 根据上述方面中的任何一个,ACC由至少一种稳定剂稳定。根据一个实施方案,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、糖类和其衍生物、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。

[0023] 本申请提供如下内容:

[0024] 1.一种药物组合物,所述药物组合物包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),用于在治疗选自肌营养不良症和轴突缺陷的疾病或状况中使用。

[0025] 2.如项目1所述的药物组合物,其中所述肌营养不良症选自杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、先天性肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、远端型肌营养不良症和Emery-Dreifuss肌营养不良症。

[0026] 3.如项目2所述的药物组合物,其中所述肌营养不良症是杜氏肌营养不良症(DMD)。

[0027] 4.如项目1所述的药物组合物,其中所述轴突缺陷是轴突损害。

[0028] 5.如项目4所述的药物组合物,其中治疗轴突损害包括促进受损神经的再生。

[0029] 6.如项目1、4和5中任一项所述的药物组合物,其中所述缺陷或损害是中枢神经系

统的神经或外周神经系统的神经的缺陷或损害。

[0030] 7. 如项目1至6中任一项所述的药物组合物,其中所述至少一种稳定剂选自:聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或碘化的有机化合物、羟基羧酸的磷酸酯或硫酸酯、二磷酸盐、糖类及其衍生物、蛋白、肽、磷酸化的蛋白、磷酸化的肽、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。

[0031] 8. 如项目7所述的药物组合物,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。

[0032] 9. 如项目1至8中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物通过全身施用被施用。

[0033] 10. 如项目9所述的药物组合物,其中所述组合物被口服施用。

[0034] 11. 如项目9或10所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制或选自片剂、胶囊、丸剂、粉末或颗粒的固体剂型;或选自酞剂、酞剂、悬浮液、糖浆、乳剂、胶体或凝胶的液体或半液体剂型。

[0035] 12. 如项目1和4至8中任一项所述的药物组合物,其中所述疾病或状况是轴突缺陷,并且所述药物组合物被局部施用。

[0036] 13. 如项目12所述的药物组合物,其中所述ACC在缺陷的或损伤的神经附近被施用。

[0037] 14. 如项目12或13所述的药物组合物,其中所述施用通过注射、输注或通过泵进行。

[0038] 15. 如项目12至14中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为选自悬浮液、乳剂、胶体或凝胶的液体或半液体剂型。

[0039] 16. 如项目1至15中任一项所述的药物组合物,其中所述稳定的ACC的一次颗粒的平均直径为约10nm至约500nm。

[0040] 17. 一种用于体外受精的方法,包括(a)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(b)体外培养胚胎,其中步骤(a)、步骤(b)或步骤(a)和(b)两者在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行。

[0041] 18. 如项目17所述的方法,包括在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中体外培养所述胚胎,从而促进胚胎发育。

[0042] 19. 如项目17或18所述的方法,进一步包括在步骤(a)之前,在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中卵母细胞的体外成熟的步骤。

[0043] 20. 一种用于改进精子质量的方法,包括将精子暴露于由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)。

[0044] 21. 如项目20所述的方法,其中改进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。

[0045] 22. 如项目21所述的方法,其中增加精子计数包括在进行运动性或前向运动性程序后增加精子计数。

[0046] 23. 一种用于分离携带X染色体和Y染色体的精子的方法,包括:(a)使精子样品与由至少一种稳定剂稳定的ACC接触,(b)进行上游程序,(c)获得包含活动精子的级分,以及

(d) 分离步骤(c)中获得的级分的上相和下相,其中所述上相富集有携带Y染色体的精子,并且所述下相富集有携带X染色体的精子。

[0047] 24. 如项目17至23中任一项所述的方法,其中所述精子、卵母细胞或胚胎是人或非人哺乳动物的精子、卵母细胞或胚胎。

[0048] 25. 如项目24所述的方法,其中所述非人哺乳动物选自由家畜动物、家养宠物、啮齿类动物和灵长类动物组成的组。

[0049] 26. 如项目24所述的方法,其中所述精子、卵母细胞或胚胎是人精子、卵母细胞或胚胎。

[0050] 27. 如项目17至26中任一项所述的方法,其中所述至少一种稳定剂选自:聚磷酸盐、磷酸化的氨基酸、有机酸、磷酸化、膦酸化、硫酸化或碘化的有机化合物、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、磷酸化的肽、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。

[0051] 28. 一种药物组合物,所述药物组合物包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),用于在治疗雄性不育中使用。

[0052] 29. 如项目28所述的药物组合物,其中所述雄性不育选自由低精子计数、低精子运动性和低精子前向运动性造成的雄性不育。

[0053] 30. 一种用于在有相应需要的受试者中治疗选自肌营养不良症和轴突缺陷的疾病或状况的方法,包括向所述受试者施用包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的药学上可接受的组合物。

[0054] 31. 如项目30所述的方法,其中所述肌营养不良症选自由以下组成的组:杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、先天性肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、远端型肌营养不良症和Emery-Dreifuss肌营养不良症,或其中所述轴突缺陷是轴突损害。

[0055] 32. 一种用于在有相应需要的受试者中治疗雄性不育的方法,包括向所述受试者向所述受试者施用包含有效量的由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的药物组合物。

[0056] 33. 如项目32所述的方法,其中所述雄性不育选自由以下组成的组:与低精子计数相关的雄性不育、与低精子运动性相关的雄性不育和与低精子前向运动性相关的雄性不育。

[0057] 34. 如项目30或33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、硫酸化或碘化的有机化合物、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。

[0058] 35. 一种用于促进细胞生长的方法,包括将细胞暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC。

## 附图简述

[0060] 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[2mM的Ca<sup>2+</sup>浓度]的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)  $\text{CaCl}_2$ 溶液(对照)。原始放大倍数X100。

[0061] 图2示出了(A)由依替膦酸稳定的ACC和(B)  $\text{CaCl}_2$ 溶液(对照)对在壳聚糖微载体(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 $\text{CaCl}_2$ 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。

[0062] 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 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度2mM):ACC-依替膦酸;ACC-ADP;胃石;结晶碳酸钙(CCC);和 $\text{CaCl}_2$ 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。

[0063] 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 $\text{CaCl}_2$ 、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。

[0064] 图5示出了如在暴露于两种ACC制备物(ACC-ET和ACC-PS)以及 $\text{CaCl}_2$ 的mdx肌细胞系中测量的肌酸激酶(CK)水平。

[0065] 图6示出了ACC(ACC-PS、ACC-PP以及对照( $\text{CaCl}_2$ ))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)。

[0066] 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( $\text{CaCl}_2$ );ACC-PS,ACC-聚磷酸盐(ACC-PP)。原始放大倍数X100。

[0067] 图8示出了口服施用不同类型的钙补充剂的小鼠(野生型和mdx小鼠)的肌酸激酶值。

[0068] 图9示出了向mdx小鼠施用稳定的ACC对它们在四肢悬挂测试中的表现的影响。

[0069] 图10示出了在具有不同浓度ACC的一步培养基(one-step medium)中,稳定的ACC对小鼠胚胎体外发育的影响。

[0070] 图11示出了在一步培养基中,稳定的ACC对小鼠胚胎体外发育的影响。

[0071] 图12示出了在卵裂培养基中,稳定的ACC对小鼠胚胎体外发育的影响。

[0072] 图13A、图13B和图13C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  $\text{Ca}^{2+}$ ,其来自:图13A-ACC,图13B- $\text{CaCl}_2$ ,或图13C-对照,无 $\text{Ca}^{2+}$ 添加。

[0073] 图14A、图14B和图14C示出了培养10天后的成骨细胞碱性磷酸酶染色随各种培养基处理的变化。培养基中补充有额外的1mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,其来自:图14A-ACC,图14B- $\text{CaCl}_2$ ,或图14C-对照,无 $\text{Ca}^{2+}$ 添加。

[0074] 图15A至图15F示出了在添加了不同来源的额外的1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 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:图15A和图15D-ACC、图15B和图15E- $\text{CaCl}_2$ ,或图15C和图15F-对照,无 $\text{Ca}^{2+}$ 添加。

[0075] 图16A和图16B示出了在体外培养的卵巢中稳定的ACC的效果(图16A),其中卵母细胞周围的颗粒细胞是完整的,以及对照(图16B)(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。

## 发明详述

[0077] 本发明公开了ACC对细胞生长和成熟的出乎意料的益处。这些属性在各种细胞生长系统中被观察到,如下文举例说明。

[0078] 根据一些特定方面,本发明提供了药物组合物,其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),用于在治疗选自神经肌肉疾病或状况的疾病或状况中使用。根据特定的实施方案,疾病可以选自肌营养不良症和轴突缺陷。根据本发明一些其他特定方面,由至少一种稳定剂稳定的ACC可以被用在辅助生殖技术(ART)中。根据一个实施方案,ART是体外受精。根据另一个实施方案,ART包含改进精子质量。

[0079] 对于本发明的每个方面,单独地和共同地使用以下术语,并且具体参数如下定义:

[0080] 术语“药物组合物”和“药学上可接受的组合物”在本文中可互换使用,并且是指包含由下文公开的至少一种稳定剂稳定的ACC与一种或更多种药学上可接受的载体一起配制的组合物。

[0081] 术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”如本文所用是指任何和所有与药物施用相容的溶剂、分散介质、防腐剂、抗氧化剂、涂布、等渗和吸收延迟剂、表面活性剂、缓冲剂及类似物。这样的介质和剂用于药学上的活性物质的用途在本领域是众所周知的。组合物可以包含其他提供补充的、额外的或促进的治疗功能的活性剂。

[0082] 根据一些实施方案,疾病或状况是轴突缺陷,因此本发明提供了包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的药物组合物,用于在治疗轴突缺陷中使用。

[0083] 术语“治疗”如本文使用的,是指采取步骤以获得有益或期望的结果,包括临床结果。有益或期望的临床结果包括但不限于缓解或改善与状况相关的一种或更多种症状。

[0084] 稳定的ACC:

[0085] 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。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无定形形式的碳酸钙。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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。根据其他实施方案,稳定剂是食品、保健品或药物级的。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 在另一个实施方案中,稳定剂是羟基羧酸的磷酸酯,例如磷酸烯醇式丙酮酸。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。

[0095] 在另一个实施方案中,稳定剂是糖类。根据一个实施方案,糖选自单糖、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例如甘油。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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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)、脒三(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、 $\alpha$ -D-半乳糖胺1-磷酸、2-磷酸-L-抗坏血酸三钠盐、 $\alpha$ -D-半乳糖1-磷酸二钾盐五水合物、 $\alpha$ -D-半乳糖胺1-磷酸、0-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。

[0100] 稳定剂可以还包括膦酸盐化合物,例如但不限于二膦酸盐、聚膦酸盐,例如但不限于焦膦酸盐或聚膦酸盐或有机聚膦酸盐,例如但不限于二磷酸腺苷(ADP)或三磷酸腺苷(ATP)。

[0101] 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。

[0102] ACC可以由多于一种稳定剂,例如两种稳定剂稳定。在一些实施方案中,第一稳定剂和第二稳定剂相似。在一些实施方案中,第一稳定剂和第二稳定剂包含不同的稳定剂。第一和第二稳定剂可以各自独立地如上文定义。稳定的ACC可以包含多于两种稳定剂,其中所述稳定剂可以是相同的或不同的。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。

[0103] 在一些实施方案中,稳定剂是蛋白或肽。在一个实施方案中,蛋白或肽是天然产生和纯化的蛋白或肽。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、 $\beta$ -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶、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螯螯虾(*C. quadricarinatus*)。根据某些实施方案,蛋白是磷酸化的蛋白。

[0104] 在一些实施方案中,稳定剂选自:聚膦酸盐、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、焦膦酸盐、乙醇、六偏磷酸盐、几丁质以及它们的任意组合。

[0105] 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、有机聚膦酸盐、糖类、其衍生物、蛋白以及它们的任意组合。

[0106] 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:聚膦酸盐、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。

[0107] 根据一些实施方案,稳定剂是聚磷酸(polyphosphate)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。

[0108] 根据一些实施方案,稳定剂是二磷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。

[0109] 如本文所用的术语“二磷酸/二磷酸盐”是指具有两个磷酸根( $PO(OH)_2$ )基团的有机化合物。该术语还涉及具有 $PO_3$ -有机- $PO_3$ 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磷酸。根据一些实施方案,二磷酸/二磷酸盐选自由依替磷酸、唑来磷酸、亚甲磷酸(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,稳定剂是依替磷酸或其药学上可接受的盐。根据另一个实施方案,稳定剂是唑来磷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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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,二磷酸/二磷酸盐是阿仑膦酸、依替磷酸、唑来磷酸或亚甲膦酸,并且P:Ca摩尔比率如上文所定义。

[0113] 根据一些实施方案,包含聚磷酸盐或二磷酸盐的稳定的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,是指最终组合中ACC的钙含量。

[0114] 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%。

[0115] 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、二磷酸盐、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,并且二磷酸/二磷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。

[0116] 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。

[0117] 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5 $\mu$ m。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的的一次颗粒是聚集的,并且聚集体的平均直径在0.5 $\mu$ m和300 $\mu$ m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100 $\mu$ m、约10至约50 $\mu$ m或约20至约40 $\mu$ m。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1 $\mu$ m和10 $\mu$ m之间。

[0118] 药物组合和施用途径:

[0119] 根据上文实施方案中的任何一个,本发明的药物组合可以由任何已知的施用途径施用。术语物质、化合物、剂或药物组合向受试者的“施用(administering)”或“施用(administration of)”可以使用本领域技术人员已知的多种方法中的一种进行。例如,化合物、剂或组合可以经肠内或肠胃外施用。肠内是指通过胃肠道包括经口、舌下或直肠施用。肠胃外施用包括静脉内、皮内、肌内、腹膜内、皮下、眼内、舌下、鼻内、由吸入、椎管内、脑内和透皮(由吸收,例如通过皮肤导管)施用。化合物或剂也可以通过可再充装或生物可降解的聚合物装置或其他装置(例如贴剂和泵)或制剂适当地引入,所述装置或制剂提供化合物或剂的延长、缓慢或控制释放。施用还可以进行例如一次、多次和/或在一个或多个延长的时间段内进行。在一些实施方案中,施用包括直接施用(包括自我施用)和间接施用(包括给药物或医用食物(medical food)开处方的行为)。例如,如本文所用,指导患者自我施用药物或医用食物,或者由另一个人施用药物或医用食物和/或向患者提供药物或医用食物处方的医师正在向患者施用药物或医用食物。根据一些实施方案,药物组合是药物食物或食物补充剂。

[0120] 在一个实施方案中,包含稳定的ACC的药物组合通过系统施用被施用。例如,稳定的ACC可以被口服、舌下或直肠施用。可选地,稳定的ACC可以被静脉内、皮内、肌内、腹膜内、皮下、眼内、舌下、鼻内、由吸入、椎管内、脑内和透皮施用。在一个具体实施方案中,稳定的ACC被口服施用。

[0121] 根据本发明的药物组合可以以任何已知的方法制备。特别地,可以使用本领域已知的方法配制药物组合,以便在施用后提供活性成分的快速、连续或延迟释放。在一个

特定的实施方案中,药物组合物被配制为选自片剂、胶囊、粉末或颗粒的固体剂型。在另一个实施方案中,药物组合物被配制为选自酞剂、酞剂、悬浮液、糖浆、乳剂或凝胶的液体或半液体剂型。药物组合物可以被配制为半固体制剂例如胶(gum)。

[0122] 意图用于口服使用的药物组合物可以根据本领域已知的用于制备药物组合物的任何方法制备,并且可以进一步包含选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的一种或更多种剂以提供药学上美观且可口的制剂。片剂包含与适合于制备片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂混合的活性剂。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒和崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂;和润滑剂。片剂任选地使用已知技术包衣,以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,并且从而提供药物在较长时间的延长释放。

[0123] 神经肌肉疾病或状况:

[0124] 根据一个实施方案,本发明提供了药物组合物,其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),用于在治疗轴突缺陷中使用。

[0125] 术语“轴突缺陷”是指外周或中枢神经系统的神经细胞的轴突部分的任何缺陷、损害或损伤。神经可以通过创伤或疾病受损。创伤性神经损伤,例如腕管综合征(carpal tunnel syndrome),是由神经压迫引起的。其他创伤,例如下跌和机动车事故,可能导致神经的切断。伤害神经的疾病包括多发性硬化、糖尿病、脊柱裂和脊髓灰质炎。多发性硬化,例如,导致轴突周围绝缘(insulating)髓鞘的分解。根据本发明的一些实施方案,缺陷或损害可以发生在脑、脊髓、从脊髓和外周神经出现的传入神经和传出神经。

[0126] 根据一些实施方案,治疗轴突缺陷包括治疗轴突损害例如损伤。根据一些另外的实施方案,治疗轴突损害包括促进受损神经的再生和/或恢复。根据另一个实施方案,治疗轴突损害包括促进神经再生。根据一些实施方案,治疗轴突缺陷包括治疗由疾病例如多发性硬化导致的缺陷。

[0127] 根据一些实施方案,轴突缺陷是轴突损害,因此本发明的药物组合物是用于在治疗轴突损害,例如轴突损伤中使用。

[0128] 在一个实施方案中,轴突损害的治疗包括促进受损神经的再生和/或恢复。

[0129] 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。

[0130] 根据一些实施方案,局部施用的药物组合物被配制成如上文定义的液体或半液体制剂。在一个实施方案中,液体或半液体制剂选自悬浮液、乳液、胶体或凝胶。在一个特定的实施方案中,稳定的ACC作为悬浮液被施用。

[0131] 缺陷的或受损的神经可以是外周神经系统(PNS)或中枢神经系统(CNS)的神经。因此在一个实施方案中,本发明的药物组合物用于治疗中枢神经系统的神经的损害。根据另一个实施方案,本发明的药物组合物用于治疗外周神经系统的损害。根据本发明的一些实施方案,本发明的药物组合物用于治疗发生在脑、脊髓、从脊髓或外周神经出现的传入神经和传出神经的损害。

[0132] 根据一个实施方案,药物组合物被局部施用。在一个更具体的实施方案中,药物组

合物在受损的神经附近被施用。根据一些实施方案,药物组合物通过注射、输注或通过泵被施用。

[0133] 根据一个实施方案,包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的药物组合物,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,用于在治疗轴突缺陷例如轴突损害中使用。

[0134] 根据一些实施方案,疾病或紊乱是肌营养不良症。因此在一个实施方案中,本发明提供了包含稳定的ACC的药学上可接受的组合物,用于在治疗肌营养不良症中使用。

[0135] 术语“肌营养不良症”如本文所用是指以进行性骨骼肌无力和脆弱为特征的多种退行性紊乱、疾病或状况的任一种。这些疾病的许多由在编码肌萎缩蛋白-糖蛋白复合物(DGC)的蛋白的基因中的突变导致。在一个实施方案中,肌营养不良症是指被鉴定为杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、先天性肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、远端型肌营养不良症或Emery-Dreifuss肌营养不良症的疾病。在一个特定的实施方案中,肌营养不良症是杜氏肌营养不良症(DMD)。因此在一个实施方案中,本发明的药学上可接受的组合物用于在治疗DMD中使用。

[0136] 在一个实施方案中,术语治疗是指缓解或改善与肌营养不良症相关的一种或更多种症状,延迟或减慢该损伤(impairment)。根据一些实施方案,治疗肌营养不良症包括推动肌管形成。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。根据一些实施方案,术语治疗肌营养不良症还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。

[0137] 根据本发明的教导,ACC由至少一种如上文描述的稳定剂稳定。根据一个实施方案,稳定的ACC是从天然来源,例如从胃石,获得的天然ACC,或是化学合成的。

[0138] 根据一个实施方案,本发明提供了用于在治疗DMD中使用的包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的药物组合物,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。根据一些实施方案,稳定剂选自磷酸丝氨酸、三磷酸盐、二磷酸盐以及它们与柠檬酸的组合。根据一个实施方案,药物组合物被系统地施用,例如口服。

[0139] 根据另一方面,本发明提供由至少一种稳定剂稳定的ACC用于药物的制备的用途,所述药物用于治疗选自轴突缺陷和肌营养不良症的疾病或状况。

[0140] 辅助生殖技术:

[0141] 根据本发明的一些方面,由至少一种稳定剂稳定的ACC可以被用在辅助生殖技术(ART)中。

[0142] 根据另一方面,本发明提供了用于体外受精的方法,包括(a)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(b)体外培养胚胎,其中步骤(a)、步骤(b)或步骤(a)和(b)两者在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行。根据一个实施方案,本发明提供了用于体外受精的方法,包括(a)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(b)在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中体外培养胚胎。在另一个实施方案中,本发明提供了用于体外受精的方法,包括(a)在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中使哺乳动物卵母细胞

体外受精;以及 (b) 体外培养胚胎。在其他实施方案中,两个步骤,即 (a) 使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及 (b) 体外培养胚胎,在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行。

[0143] 根据一些实施方案,步骤 (a) 和 (b) 的细胞培养基可以在一个实施方案中是不同的培养基。在另一个实施方案中,所述培养基可以是相同的培养基。

[0144] 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。

[0145] 根据本发明的教导,在包含ACC的细胞培养基中培养胚胎促进胚胎发育。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(blastocoel)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。

[0146] 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成熟的胚胎的比例。促进是通过相对于经历相同程序但细胞培养基中没有ACC的对照样品来测量的。因此在一个实施方案中,该方法包括在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中体外培养所述胚胎,从而促进胚胎发育和/或改进胚胎质量。

[0147] 如本文所用的术语“胚胎质量”,是指通过任何已知且可接受的方法对胚胎发育的评估。胚胎分级(grading)在胚胎阶段的选择和用于胚胎质量评估的标准方面可能不同。植入前胚胎质量的评价有几个阶段。这些方法中的一些在Nasiri和Eftekhari-Yazdi (Cell Journal, 2015, 16(4), 392-405)中被描述。在一个实施方案中,改进胚胎质量包括增加达到致密化、胚泡形成或透明带孵化阶段的胚胎比例。

[0148] 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,并且指用于或能够支持细胞、组织或器官的生长的细胞培养基。细胞培养基可以是液体、固体或半固体。不同的细胞培养基可具有不同的性质并且包含不同的盐和营养,然而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。在一个特定的实施方案中,“生长培养基”适合于胚胎的生长。胚胎细胞培养基在本领域中是众所周知的,并且其内含物可以根据例如胚胎的阶段而变化,并且本领域的技术人员将知道根据他的需要调整细胞培养基。根据上述实施方案中的任何一个,由至少一种稳定剂稳定的ACC可以添加到适合于卵母细胞和/或胚胎生长或发育的任何已知培养基中。非限制性实例是单培养物培养基例如SAGE 1-Step™和/或连续培养基例如Quinns Advantage™连续培养基(ORIGIO)。

[0149] 根据一些实施方案,该方法包括在步骤 (a) 之前,在包含由至少一种稳定剂稳定的

ACC的细胞培养基中卵母细胞的体外成熟的步骤。因此在一个实施方案中,本发明提供了用于体外受精的方法,包括(a)卵母细胞的体外成熟;(b)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(c)体外培养胚胎,其中步骤(a)和(b)、步骤(a)和(c)或步骤(a)、(b)和(c)在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行。

[0150] 根据本发明的教导,在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中培养卵母细胞促进卵母细胞成熟,因此该方法包括促进卵母细胞成熟。术语“卵母细胞成熟”是指这样的过程和它的每一个阶段,卵母细胞藉以从不能受精的未成熟状态发展到减数分裂成熟、可受精并能产生活胚胎的卵母细胞。促进卵母细胞成熟是指加快卵母细胞成熟的过程,以及增加卵母细胞达到成熟阶段的可能性。因此,在一个实施方案中,该方法包括促进卵母细胞成熟。在其他实施方案中,该方法包括在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的培养基中的卵母细胞和胚胎的成熟,因此促进卵母细胞成熟和胚胎发育。

[0151] 术语“促进”如本文所用是指推动、改进、增强,通常增加生长参数,并且相对于生长在相同但是无ACC的培养基上的对照样品被测量。

[0152] 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。根据一个实施方案,ACC以约0.8mM至约5mM或约1.3mM至约3.5mM的最终浓度,或以约1.7mM至约2.6mM的最终浓度被添加。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。

[0153] 根据一个实施方案,将稳定的ACC与卵母细胞和/或胚胎接触促进胚胎发育和/或卵母细胞成熟约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%。促进100%意味着参数(例如增殖)增加到2倍;促进200%意味着参数(如胚胎发育)增加到3倍,等等。根据一些实施方案,将稳定的ACC与卵母细胞和/或胚胎接触促进胚胎发育和/或卵母细胞成熟50%至约300%、约100%至约250%、约150%至约250%。

[0154] 根据一些实施方案,卵母细胞成熟的促进和/或胚胎发育的促进促进IVF的结果。因此根据一个实施方案,本发明提供了用于促进IVF程序的方法,所述方法包括将卵母细胞暴露于稳定的ACC、将胚胎暴露于稳定的ACC或将卵母细胞和胚胎两者暴露于稳定的ACC。

[0155] 根据另一个实施方案,该方法还包括从哺乳动物雌性取出至少一个卵母细胞和/或将胚胎植入哺乳动物雌性。

[0156] 在上述实施方案的任何一个中,胚胎和/或卵母细胞是人或非人哺乳动物胚胎和/或卵母细胞。在一个特定的实施方案中,胚胎和/或卵母细胞是人胚胎和/或卵母细胞。在另一个实施方案中,胚胎和/或卵母细胞是非人哺乳动物胚胎和/或卵母细胞。非人哺乳动物胚胎和/或卵母细胞的非限制性实例是家畜动物、家养宠物、啮齿类动物、兔形目动物、蝙蝠和灵长类动物胚胎和/或卵母细胞。在一个实施方案中,非人哺乳动物胚胎是家畜动物,例如牛、猪、绵羊、山羊、马、骡、驴、水牛或骆驼的胚胎。在一个特定的实施方案中,胚胎和/或卵母细胞是牛胚胎和/或卵母细胞。在其他实施方案中,家养宠物胚胎和/或卵母细胞是猫或狗胚胎和/或卵母细胞;啮齿类动物胚胎和/或卵母细胞是小鼠、大鼠、豚鼠或仓鼠的胚胎

和/或卵母细胞;兔形目动物胚胎和/或卵母细胞是兔胚胎和/或卵母细胞;并且灵长类动物胚胎和/或卵母细胞是猴例如猕猴或猿例如黑猩猩的胚胎和/或卵母细胞。

[0157] 根据上述实施方案中的任何一个,由至少一种稳定剂稳定的ACC可以添加到适合于卵母细胞和/或胚胎发育或成熟的任何已知培养基中。这样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)。

[0158] 根据一个实施方案,本发明提供了用于体外受精的方法,包括(a)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(b)体外培养胚胎,其中步骤(a)、步骤(b)或步骤(a)和(b)两者在补充有由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行,所述稳定剂选自磷酸丝氨酸、三磷酸盐、依替膦酸、焦磷酸盐、乙醇、几丁质、六偏磷酸盐、柠檬酸以及磷酸丝氨酸、三磷酸盐、依替膦酸或六偏磷酸盐与柠檬酸的组合。根据另一个实施方案,该方法包括在步骤(a)之前,在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中卵母细胞的体外成熟的步骤。因此在一个实施方案中,本发明提供了用于促进体外受精的方法,包括(a)卵母细胞的体外成熟;(b)使哺乳动物卵母细胞体外受精;以及(c)体外培养胚胎,其中步骤(a)和(b)、步骤(a)和(c)或步骤(a)、(b)和(c)在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的细胞培养基中进行。根据一个实施方案,适合于胚胎生长的培养基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)。根据一个实施方案,ACC以约0.8mM至约5mM或约1.3mM至约3.5mM的最终浓度,或以约1.7mM至约2.6mM的最终浓度被添加。根据一个实施方案,该方法包括促进卵母细胞成熟和/或促进胚胎发育。根据另一个实施方案,该方法包括改进胚胎质量并且从而增加IVF的成功率。

[0159] 根据一些实施方案,本发明提供了用于胚胎体外产生的方法,包括(a)使卵母细胞体外受精;以及(b)在包含由至少一种稳定剂稳定的ACC的胚胎培养基中体外生长胚胎。根据一些实施方案,该方法包括在步骤(a)之前从哺乳动物雌性取出至少一个卵母细胞。

[0160] 根据一个方面,本发明提供了用于改进精子质量的方法,所述方法包括将精子暴露于有效量的由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)。

[0161] 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。

[0162] 根据一个实施方案,改进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。

[0163] 术语“精子运动性”如本文所用是指在给定样本样品中所有精子细胞之间移动的精子比例。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。

[0164] 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。

[0165] 术语“促进”如本文定义所用。根据一些实施方案,促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数包括促进精子运动性、促进精子前向运动性、增加精子计数约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100%意味着参数(例如运动性)增加到2倍。根据一些实施方案,将运动性或精子计数提高约100%至约500%、约120%至约400%、约150%至约300%。

[0166] 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。

[0167] 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。

[0168] 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,非哺乳动物选自自由鱼、昆虫和鸟组成的组。

[0169] 根据一个实施方案,精子是人精子。

[0170] 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组分例如稳定的ACC的环境的培养基中,或将组分例如稳定的ACC添加到细胞生长或培养于其中的培养基中,或将稳定的ACC添加到精子被放置于其中的环境中。根据一些实施方案,暴露于稳定的ACC包括在受试者的身体内使细胞与ACC接触。

[0171] 根据上述实施方案中的任何一个,由至少一种稳定剂稳定的ACC可以添加到适合于精子处理或成熟的任何已知培养基中。根据一些实施方案,培养基选自精子分离培养基例如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®)和改良的具有庆大霉素的HTF培养基-HEPES,以及用于获能的培养基例如Biggers-Whitten-Whittingham (BWW) 培养基、Ham氏-F10和改良的Tyrode培养基(HSM)。

[0172] 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。根据一个实施方案,ACC以约0.8mM至约5mM或约1.3mM至约3.5mM的最终浓度,或以约1.7mM至约2.6mM的最终浓度被添加。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。

[0173] 根据上述实施方案中的任何一个,该方法还包括精子在IVF或在宫腔内人工授精中的使用。

[0174] 根据另外的方面,本发明提供了用于分离携带X染色体和Y染色体的精子的方法,所述方法包括:(a)使精子样品与由至少一种稳定剂稳定的ACC接触,(b)进行前向运动性程

序, (c) 获得包含活动精子的级分, 以及 (d) 分离步骤 (c) 中获得的级分的上相和下相, 其中所述上相富集有携带Y染色体的精子, 并且所述下相富集有携带X染色体的精子。该方法涵盖具有X染色体的精子细胞和具有Y染色体的精子细胞之间的分离。

[0175] 根据一个实施方案, 前向运动性程序是上游程序。上游程序在本领域中是众所周知的。一般来说, 精子样品被放置在试管底部并用精子培养基层覆盖, 试管在37°C孵育至约1小时, 允许活动精子移动离开样品进入精子培养基。然后收集精子培养基并将其分离至富集有携带Y染色体的精子的上相和富集有携带X染色体的精子的下相。根据一些实施方案, 可以使用短的孵育时间, 例如10至30分钟。

[0176] 根据一些实施方案, 该方法还包括上相和/或下相在IVF或宫腔内人工受精中的使用。

[0177] 根据一些方面, 本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的ACC在辅助生殖技术 (ART) 中的使用。根据一些实施方案, ART选自体外受精 (IVF) 以及精子改善。

[0178] 根据一个实施方案, 本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的ACC在IVF中的使用。根据一个实施方案, 稳定的ACC在选自体外卵母细胞成熟、使哺乳动物卵母细胞体外受精、体外培养胚胎以及它们的任意组合的阶段被添加到细胞培养基。因此在一个实施方案中, 稳定的ACC在体外培养胚胎阶段被添加到细胞培养基。在另一个实施方案中, 稳定的ACC在卵母细胞成熟阶段被添加到细胞培养基。根据另外的实施方案, 稳定的ACC在卵母细胞成熟期间以及在体外培养胚胎期间被添加。根据一个实施方案, 稳定的ACC促进卵母细胞成熟和/或胚胎发育。

[0179] 根据另一个实施方案, 本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的ACC在改进精子质量中的用途。根据一些实施方案, 改进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。根据一些实施方案, 由这种方法获得的精子可以在宫腔内人工授精或在IVF中使用。

[0180] 根据另一个实施方案, 本发明提供了由至少一种稳定剂稳定的ACC, 用于在辅助生殖技术 (ART) 中使用。根据一些实施方案, ART选自体外受精 (IVF)、精子改善。

[0181] 根据一个实施方案, 稳定的ACC用于在IVF中使用。根据一个实施方案, 稳定的ACC用于在选自体外卵母细胞成熟、使哺乳动物卵母细胞体外受精、体外培养胚胎以及它们的任意组合的阶段中使用。根据一些实施方案, 稳定的ACC被添加到选自如上文定义的用于体外卵母细胞成熟的培养基、用于使哺乳动物卵母细胞体外受精的培养基以及用于体外培养胚胎的培养基的培养基中。

[0182] 根据另一个实施方案, 稳定的ACC用于在改进精子质量中使用。根据一些实施方案, 该方法包括将精子暴露于稳定的ACC。根据一些实施方案, 改进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。根据一些实施方案, 由这种方法获得的精子可以在宫腔内人工授精或在IVF中使用。

[0183] 根据一个实施方案, 稳定的ACC被用于分离携带X染色体和Y染色体的精子, 通过: (a) 使精子样品与由至少一种稳定剂稳定的ACC接触, (b) 进行上游程序, (c) 获得包含活动精子的级分, 以及 (d) 分离步骤 (c) 中获得的级分的上相和下相, 其中所述上相富集有携带Y染色体的精子, 并且所述下相富集有携带X染色体的精子。

[0184] 根据上述实施方案中的任何一个, 使卵母细胞或精子与稳定的ACC接触包括将稳

定的ACC添加到如上文定义的细胞培养基。

[0185] 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。根据一个实施方案,ACC以约0.8mM至约5mM或约1.3mM至约3.5mM的最终浓度,或以约1.7mM至约2.6mM的最终浓度被添加。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。

[0186] 根据另一方面,本发明提供了药物组合物,其包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC),用于在治疗雄性不育中使用。

[0187] 根据一些实施方案,雄性不育选自自由低精子计数造成的雄性不育以及由低精子运动性造成的雄性不育。术语“低精子运动性”是指用于IUI的活动精子数少于5百万的状况。

[0188] 根据一些实施方案,药物组合物可以如上文描述的通过任何已知方法被施用。根据一个实施方案,药物组合物被口服施用。

[0189] 根据一个方面,本发明提供了用于在有相应需要的受试者中治疗雄性不育的方法,包括向所述受试者施用包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的药物组合物。

[0190] 根据另一方面,本发明提供了用于在有相应需要的受试者中治疗选自肌营养不良症和轴突缺陷的疾病或状况的方法,包括向所述受试者施用包含由至少一种稳定剂稳定的无定形碳酸钙(ACC)的药学上可接受的组合物。

[0191] 术语“药学上可接受的组合物”、“ACC”、“稳定剂”、“轴突缺陷”和“肌营养不良症”如上文所定义。

[0192] 根据一个实施方案,本发明提供了用于在有相应需要的受试者中治疗轴突缺陷的方法,包括向所述受试者施用包含治疗有效量的由至少一种稳定剂稳定的ACC的药学上可接受的组合物。根据一个实施方案,轴突缺陷是轴突损害,例如轴突损伤。根据某些实施方案,轴突缺陷或损害是中枢神经系统的神经或外周神经系统的神经的轴突缺陷或损害。根据一些实施方案,治疗轴突损害包括促进受损神经的恢复和/或再生。

[0193] 根据一些实施方案,施用包括通过系统施用或局部施用施用药学上可接受的组合物,如上文所描述。根据一些实施方案,系统施用包括肠内施用,即通过胃肠道,例如经口、舌下或直肠,以及肠胃外施用,例如静脉内、皮内、肌内、腹膜内、皮下、眼内、舌下、鼻内、由吸入、椎管内、脑内和透皮。根据一个实施方案,药物组合物被口服施用。根据其他实施方案,施用是局部施用,特别是在缺陷的(defected)、受损的(damaged)或损伤的(injured)神经附近。根据一个实施方案,药学上可接受的组合物通过注射、输注或通过泵被局部施用。

[0194] 根据另一个实施方案,本发明提供了用于在有相应需要的受试者中治疗肌营养不良症的方法,包括向所述受试者施用包含治疗有效量的由至少一种稳定剂稳定的ACC的药学上可接受的组合物。根据一些实施方案,肌营养不良症选自自由以下组成的组:杜氏肌营养不良症、贝克肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、先天性肌营养不良症、面肩肱型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、远端型肌营养不良症和Emery-Dreifuss肌营养不良症。在一个特定的实施方案中,肌营养不良症是杜氏肌营养不良症

(DMD)。

[0195] 用于促进细胞生长的方法：

[0196] 根据一些方面，本发明提供了用于促进细胞生长的方法，包括将细胞暴露于由至少一种稳定剂稳定的ACC。

[0197] 术语“生长”如本文所用涵盖下列任何一种：增殖、成熟、繁殖、再生、分化、发育、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。

[0198] 如上文所定义，术语“促进”是指推动、改进、增强，通常增加生长参数，并且相对于生长在相同但是无ACC的培养基上的对照样品被测量。因此在一个实施方案中，该方法包括促进增殖、促进成熟、促进繁殖、促进再生、促进成熟和/或促进细胞的分化。在一个实施方案中，促进生长包括改进细胞质量，例如改进胚胎质量。根据另一个实施方案，促进生长包括促进以上参数的两个或更多个，例如促进增殖和分化。

[0199] 根据上述实施方案中的任何一个，细胞是真核生物细胞。根据一些实施方案，真核生物细胞选自动物、植物和昆虫细胞。

[0200] 根据一个实施方案，细胞是动物细胞。根据一些实施方案，动物细胞是人或非人哺乳动物的细胞。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）。

[0201] 根据另外的实施方案，细胞选自神经、肌肉、上皮、骨、脂肪、干细胞、配子细胞、血细胞和胚胎。

[0202] 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，促进肌肉细胞的生长包含促进肌管形成。

[0203] 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。

[0204] 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。

[0205] 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。

[0206] 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。

[0207] 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。

[0208] 根据一些实施方案，该方法包括促进细胞成熟，例如促进卵母细胞的体外成熟。根据一些实施方案，卵母细胞选自人卵母细胞和非人哺乳动物卵母细胞。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）。

[0209] 根据其他实施方案，该方法包括改进体外培养的胚胎质量，或促进胚胎发育。术语“胚胎质量”如上文定义的被使用。在一个实施方案中，改进胚胎质量包括增加达到选自致密化、胚泡形成和胚泡孵化阶段组成的组的阶段的胚胎比例。在另一个实施方案中，改进

胚胎质量包括加速正常胚胎发生,其由达到选自由致密化、胚泡形成和胚泡孵化阶段组成的组的阶段的时间所测量。

[0210] 根据一些实施方案,胚胎选自人胚胎或非人哺乳动物胚胎。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)。

[0211] 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(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%。

[0212] 根据一些实施方案,该方法包括促进干细胞的分化。根据一个实施方案,该方法包括促进干细胞的增殖。根据另外的实施方案,该方法包括促进干细胞的分化和增殖。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。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。根据另外的实施方案,干细胞是间充质干细胞。根据又一个实施方案,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。

[0213] 根据一些实施方案,细胞培养基适合于动物、植物或昆虫细胞的生长。根据一个实施方案,细胞培养基可以是天然培养基或人工培养基。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。

[0214] 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。

[0215] 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细胞培养基。根据另一个实施方案,人工培养基是无蛋白培养基。

[0216] 可以向其中添加稳定的ACC并且可以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。

[0217] 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、William培养基E和体外受精培养基,例如global®、GM501、SSM™、卵裂K-SICM、胚胎K-SIBM、Quinns Advantage®卵裂、Quinns Advantage®胚胎、FERTICULT™ IVF Medium、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;以及用于成熟的培养基,其使得未成熟卵母细胞的培养物能够完全发育成适合于转移的胚胎。

[0218] 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改性培养基、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、RPMI 1640、MEM、IMDM、opti-MEM、GMEM、Ham氏F-12和DMEM/F-12、Schneider果蝇培养基、Grace昆虫培养基、Sf-900、TC-10、IPL-10培养基以及用于精子分离、洗涤或成熟的培养基,例如选自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。

[0219] 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。

[0220] 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。

[0221] 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

[0222] 实施例1.ACC对SC-DRG共培养物的影响

[0223] 方法

[0224] 培养基

[0225] 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,25 $\mu$ g/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)。

[0226] NVR-Gel作为神经元培养的基质

[0227] 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<sup>6</sup> 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裹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。

[0228] 神经元组织培养物的制备

[0229] 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400 $\mu$ m)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 $^{\circ}$ C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。

[0230] Ca<sup>2+</sup>补充剂来源

[0231] 在接种阶段向凝胶中添加一次最终浓度为1或2mM的Ca<sup>2+</sup>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<sub>2</sub>溶液-对照。

[0232] 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。

[0233] 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。

[0234] 神经元培养物的免疫荧光染色

[0235] 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。

#### [0236] 结果

[0237] 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<sub>2</sub>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<sup>2+</sup>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<sub>2</sub>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。

[0238] 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。

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
胃石	66.6
CCC(结晶碳酸钙)	50
CaCl <sub>2</sub> 水溶液(对照)	50
ET	33.3
PS	0

#### [0240] 实施例2.ACC对脑培养物的影响

[0241] 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。

#### [0242] 实施例3-ACC制剂对健康骨骼肌细胞的影响

##### [0243] 方法

##### [0244] 骨骼肌培养物的制备

[0245] 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,  $1 \times 10^5$ 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。

[0246] 涂有明胶的培养板

[0247] 将在水中的1%猪明胶储备溶液用高压釜灭菌。一旦冷却, 将500 $\mu$ l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。

[0248] 增殖培养基

[0249] 对于增殖阶段, 将细胞培养在: DMEM/F12 (包含1mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) + 10% FBS、25 $\mu$ g/mL庆大霉素以及2mM L-谷氨酰胺中。

[0250] 融合培养基

[0251] 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  $\text{Ca}^{2+}$ )、2%马血清 (HS)、2mM L-谷氨酰胺、25 $\mu$ g/mL庆大霉素、和4单位/100mL胰岛素 (均购自 Biological-Industries, 以色列)。

[0252] 测试的钙制剂的列表

[0253] 用表2中列出的、 $\text{Ca}^{2+}$ 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,  $\text{Ca}^{2+}$ 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。

[0254] 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)。

[0255] 表2-测试的材料列表

添加的物质	总钙浓度(mM), 包括培养基中的 1 mM Ca <sup>2+</sup> 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
[0256] 结晶碳酸钙(CCC)(可商购的粉末)	2
CaCl <sub>2</sub> 水溶液	2
ET	1
PyP	1
PS	1
ATP	1
ADP	1
植酸	1
柠檬酸	1
对照	1

[0257] 结果

[0258] 干ACC对健康骨骼肌的影响

[0259] 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<sup>2+</sup>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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)。

[0260] 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<sub>2</sub>的培养物中,肌肉收缩仅在10天或更长时间后才出现。

[0261] 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。

[0262] 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

[0263] 方法

[0264] Mdx细胞制备

[0265] 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。

[0266] 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<sup>4</sup>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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>的最终浓度是2mM。

[0267] 表3:钙源

处理	钙源 (2mM)
对照	CaCl <sub>2</sub>
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

[0269] 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。

[0270] 在肌肉组织培养物中的肌酸激酶(CK)分析

[0271] 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<sup>2+</sup>)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。

[0272] 结果

[0273] 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<sub>2</sub>)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。

[0274] 实施例5-钙源对原代mdx小鼠细胞的影响

[0275] 方法

[0276] 原代细胞的提取

[0277] 在无菌条件下,从新生(一日龄)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。

[0278] 将细胞以2×10<sup>5</sup>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/0 Ca<sup>2+</sup>。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<sup>2+</sup>,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。

[0279] 表4. 在原代细胞研究中使用的钙源

处理	钙源 (2mM)
----	----------

对照	CaCl <sub>2</sub>
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

[0281] 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。

[0282] 结果

[0283] 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。

[0284] 实施例6-评测ACC对小鼠中肌营养不良症的影响-体内研究

[0285] 实验小鼠口服施用(通过喂食或饮用)对照或测试项目。每天重复施用对照或测试项目,直到研究终止(12周后)。

[0286] 表5. 研究设计

组号	品系	n=	处理细节
1M	C57BL	n=3	啮齿类动物商业饮食(Teklad)
2M	mdx	n=12	啮齿类动物商业饮食(Teklad)
3M		n=12	含有 1%来自合成 CCC 的元素钙的低钙饮食 (TDK95027, Harlan Inc), 自由采食
4M		n=12	含有 1%来自合成 ACC (5% PS)的元素钙的低钙饮食(TDK95027, Harlan Inc), 自由采食

[0288]	5M	n=12	含有 0.06%来自合成 ACC (10% PP)的元素钙的水, 自由采食
--------	----	------	---------------------------------------

[0289] PS-用磷酸丝氨酸稳定的;PP-用聚磷酸盐稳定的测试系统:

[0290] 物种:小鼠

[0291] Mdx品系:C57/BI 10ScSn/DMD mdx/J

[0292] 野生型品系:C57BL/6J0IaHsd.

[0293] 性别和年龄:雄性,在研究启动时3周龄

[0294] 体重:研究启动时动物的体重变化不应超过该性别平均体重的±5%。

[0295] 圈养:研究启动前,将动物圈养在测量为42.5×26.5×18.5cm的聚乙烯笼子里,该笼子具有使成团的食物和在塑料瓶中的饮用水便利的不锈钢顶架,并填充刨花 (Harlan Teklad Aspen/Sani-chips垫)作为垫料。垫料随笼子一起至少一周更换一次。

[0296] 识别:耳标和笼子卡片。

[0297] 终止:在研究结束时,动物由CO<sub>2</sub>窒息被安乐死。

[0298] 合理原因:MDX小鼠是用于评测杜氏肌营养不良症 (DMD) 的常用动物模型。

[0299] 研究启动定义

[0300] 对照或测试项目的第一次施用被定义为“第1天”。

- [0301] 研究结束定义
- [0302] 研究在从开始12周后终止。
- [0303] 人道主义终点
- [0304] 将被发现处于垂死状况的动物和示出严重疼痛或忍受严重痛苦迹象的动物人道安乐死。报告了示出从初始体重大于20%的体重下降的动物。
- [0305] 测试项目施用
- [0306] 通过食物或通过饮用向动物施用ACC。通过食物向动物施用CCC。通过喂食施用对照。每天重复施用对照或测试项目,直到研究结束。
- [0307] 测试和评测
- [0308] 发病率和死亡率观察
- [0309] 在研究终止时每天对发病率和死亡率的迹象进行观察。
- [0310] 体重测量
- [0311] 每周一次并在研究终止(12周)时记录体重测量。
- [0312] 对于肌酸激酶(CK)水平的血液收集和血清制备:
- [0313] 在研究终止时,在氯胺酮/赛拉嗪(Ketmaine/Xylazine)的轻度麻醉下,直接从所有动物的眶后窝抽取血液样品。
- [0314] 将200 $\mu$ l血液收集到带有凝血激活剂凝胶的黄色杯试管(yellow-cup tube)中。将试管在室温保持持续至少30分钟以凝结,并在室温以4000RPM离心持续10分钟。将血清样品储存在2-4 $^{\circ}$ C,直到被运送到A.M.L实验室以进行CK分析。
- [0315] 肌酸激酶-结果
- [0316] 肌酸激酶测试的结果示出在图8中,并且展示明显趋势。所有mdx小鼠相对于野生型示出了升高的CK值,其表明对肌肉的破坏。然而,与只接受正常饮食的组(2M组;学生t检验,P值=0.034)相比,通过食物接受ACC的组(4M组)中的升高明显更缓和。虽然接受CCC的3M组小鼠与2M组小鼠(无处理)相比,CK水平也示出了更缓和的升高,但差别在统计学上不显著(学生t检验,P值=0.45)。
- [0317] 通过饮用接受ACC的5M组展示了与那些通过食物接受CCC的3M组相似的结果(分别是21,164 $\pm$ 8,391和21,676 $\pm$ 14,508IU/ml)。不希望受任何理论或作用机制的约束,认为在4M组(在食物中的ACC)和5M组(通过饮用的ACC)结果之间差别的原因可能是由于ACC悬浮液的异质性,并且由此ACC的不均匀施用。但是明显的是,ACC的施用显著缓解了mdx小鼠中的DMD症状。
- [0318] 实施例7-评测ACC消耗对在MDX小鼠中肌营养不良症的影响。
- [0319] 在本实施例中,测试了由不同稳定剂稳定的ACC对mdx小鼠(杜氏肌营养不良症的啮齿类动物模型)的影响。
- [0320] 测试物品
- [0321] 向小鼠每天口服施用(喂食)或连续地每周六次通过IP注射施用稳定的ACC。将对照和测试项目相似地施用。
- [0322] 测试系统:
- [0323] 物种:小鼠
- [0324] Mdx品系:C57/BI 10ScSn/DMD mdx/J

- [0325] 野生型品系:C57BL/6J0IaHsd.  
 [0326] 性别和年龄:雄性,在研究启动时3-5周大  
 [0327] 体重:研究启动时动物的体重变化不应超过该性别平均体重的±15%。  
 [0328] 组大小:参见表1,研究设计  
 [0329] 组的数目:6(参见表6)  
 [0330] 表6.研究设计

组号	品系	n =	组名以及处理细节	施用途径	持续时间
1M	C57BL-啮齿类动物	6	野生型对照-商业饮食(Teklad)	喂食	24周
2M		8	Mdx 对照-商业饮食		
4M		10	由 PS 稳定的 ACC-含有 1%来自合成 ACC (5% PS)的元素钙的低钙饮食 (TDK95027, Harlan Inc.) 自由采食		
3M		10	由 TP 稳定的 ACC-含有 1%来自合成 ACC (6% TP-2%柠檬酸)的元素钙的低钙饮食 (TDK95027, Harlan Inc.) 自由采食		
5M			由 TP 稳定的 ACC-200 µl 含有 0.1%		
	MDX-啮齿类动物	10	来自合成 ACC (10% TP)的元素钙注射每周连续 6 次进行	腹膜内 (IP)注射	12周
6M		6	对照-盐水对照-200 µl 包含盐水。媒介物注射每周连续 6 次进行		

- [0333] PS-磷酸丝氨酸;TP:三磷酸盐  
 [0334] 实验程序:  
 [0335] MDX小鼠是用于评测杜氏肌营养不良症 (DMD) 的常用动物模型。  
 [0336] 研究结束定义:对于1-4组研究在从开始24周后终止,以及对于5-6组,在从开始12周后终止。  
 [0337] 测试项目施用  
 [0338] 向所有动物(除对照之外)通过食物(每天)或通过IP注射(每周连续6次)施用稳定的ACC。  
 [0339] 测试和评测  
 [0340] 临床迹象观察  
 [0341] 每周一次观察动物的临床迹象,直到研究终止。  
 [0342] 对于在皮肤、毛发、眼睛、粘膜、呼吸系统、分泌物和排泄物(例如腹泻)的出现中的

任何变化进行观察。也包括步态、姿势和对处理的响应的变化,如奇怪行为、震颤、抽搐、睡眠和昏迷的出现。

[0343] 记录了所有观察到的异常、中毒迹象、垂死状况和终止前死亡。

[0344] 对于测试结果的解释,在测试中被人为处死的动物被考虑为在测试中死亡的动物。

[0345] 体重测量

[0346] 体重测量每周一次、在四肢悬挂测试之前立即记录次。在研究的开始和终止,体重也被测量。

[0347] 功能性测试-四肢悬挂测试(抓握测试)

[0348] 四肢悬挂测试被用于监测肌肉力量,并指示神经肌肉损伤和运动协调(motor coordination)。测试被用于确定ACC的效力。

[0349] 在四肢悬挂测试中,丝载网系统被使用以测量小鼠呈现持续的对抗它们的重力的肢体张力的能力。悬挂时间以秒以及最小保持冲量(保持冲量=体重x悬挂时间, [N sec], 转换系数- $9.806 \times 10^3$  牛顿/克)测量。

[0350] 抓握测试(四肢悬挂测试)根据TREAT-NMD SOP#DMD\_M.2.1.005方案进行。简要地说:

[0351] 将小鼠(最小龄-4周)放置在载网上(载网方形大小约 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ )并且允许适应这种环境3-5秒。

[0352] 将载网翻转,以至于小鼠上下颠倒。将载网高度放置在笼子地板上方至少35cm处。将足够量的软垫(5-7cm)放置在载网下方以确保软着陆。在4-24周龄的小鼠自然地试图保持在载网上并避免下跌到地面。这个高度足够低,不致以使动物受伤,并且足够高以保证避免下跌。

[0353] 每个悬挂时间段必须以全部4只小鼠爪都抓握载网开始。悬挂时间由秒表测量并记录。

[0354] 测试最多进行长达600秒或重复3次,伴随着至少2分钟的休息时间。

[0355] 最长的悬挂时间被用于评估保持冲量(Holding impulse)。

[0356] 在整个实验期间,每周进行四肢悬挂测试。

[0357] 对于肌酸激酶(CK)水平的血液收集和血清制备:

[0358] 在研究终止时,在氯胺酮/赛拉嗪(Ketmaine/Xylazine)的轻度麻醉下,直接从所有动物的眶后窦抽取血液样品。

[0359] 将 $200 \mu\text{l}$ 血液收集到带有凝血激活剂凝胶的黄色杯试管中。将试管在室温保持持续至少30分钟以凝结,并在室温以4000RPM离心持续10分钟。将血清样品储存在 $2-4^\circ\text{C}$ ,直到被运送到A.M.L实验室以进行CK分析。

[0360] 研究终止和尸体剖检

[0361] 在终期出血后,动物由二氧化碳窒息而处死,并进行大体病理,检查主要组织和器官系统。

[0362] 骨骼肌收集

[0363] 在尸体剖检期间,收集了来自所有动物的骨骼肌(隔膜肌、心肌和腓肠肌)。将来自所有动物的肌肉保存在10%中性缓冲的福尔马林(约4%甲醛溶液)中持续至少24小时,用

于将来的组织病理学检查。

[0364] 结果

[0365] 所有组中的小鼠增加了体重。在任何一组中,在平均体重方面没有发现显著差别。

[0366] 功能性测试-四肢悬挂测试-中间结果

[0367] 在口服施用ACC制剂(稳定剂1-磷酸丝氨酸、稳定剂2-三磷酸盐)的两个mdx组中与施用标准饮食(包含钙)的对照组相比在保持冲量(HI)方面发现显著差别,参见图9。在研究的第二周已经观察到差别,其中ACC处理的小鼠的HI为对照组的HI的2倍高。这种差别随着研究的进展而增加,并在大约6-8周后达到平稳期。从图9可以看出,ACC处理的小鼠的HI是对照组的约X2-X3.8倍高。

[0368] 实施例8.在ACC补充的培养基中胚胎发育的促进

[0369] 材料和方法

[0370] 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)。

[0371] 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20 $\mu$ L液滴中,并在37.0 $^{\circ}$ C在5% CO<sub>2</sub>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<sub>3</sub>)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%)。

[0372] 结果

[0373] 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7中。

[0374] 表7.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

[0375]

	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)

[0376] 实施例9.

[0377] 将补充有1.7mM ACC-PP或氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)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8(测试A)和表9(测试B)中。

[0378] 表8:测试A:在补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 或ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较

	2 细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3
$\text{CaCl}_2$	25	16 (64)	16 (64)

[0380]	ACC-PP	26	24 (92.3)	22 (84.6)
--------	--------	----	-----------	-----------

[0381] 表9:测试B:在补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 或ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较

[0382]		2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3	孵化/d4
	$\text{CaCl}_2$	27	20 (70)	20 (74)	11 (40.7)
	ACC	23	23 (100)	23 (100)	23 (100)

[0383] 实施例10.

[0384] 补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 、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10中。

[0385] 表10.在补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 、1.7mM或0.85mM ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较。

[0386]		2细胞/d1	致密化/d2	胚泡/d3	孵化/d4
	$\text{CaCl}_2$	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)

[0387] 实施例11.

[0388] 测试在补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 、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11中。

[0389] 表11.在未处理的卵裂培养基和补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 、1.7mM或0.85mM ACC-PP的卵裂培养基中生长的胚胎的比较。

[0390]		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)
	$\text{CaCl}_2$	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)

[0391] 实施例12

[0392] 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  $\text{CaCl}_2$ 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12中。

[0393] 表12.在补充有1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 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。

	CaCl <sub>2</sub>	ACC-PP	CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	ACC-PP	ACC-PP	CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	ACC-PP	ACC-PP	CaCl <sub>2</sub>	ACC-PP	CaCl <sub>2</sub>	ACC-PP
[0394]	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)	<sup>3</sup> (27.3)	0 (0)	2 (18.2)
2	9	13	3	6	4	9	0	3	0	5	<sup>2</sup> (22.2)	<sup>5</sup> (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)

[0395] 实施例13

[0396] 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13中。

[0397] 表13: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。

	小鼠 1	小鼠 2	小鼠 3-7			
[0398]	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)	

[0399] 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。

[0400] 实施例14.

[0401] 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14中。

[0402] 表14: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。

	Cont Q	ACC-PP2.6	ACC-PP1.3	ACC-PP0.6	PP
[0403] 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)

[0404] 实施例15.

[0405] 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15中。

[0406] 表15.在未处理的卵裂培养基或补充有3.3mM ACC-PP或3.3mM CCC的培养基中生长的胚胎的比较。

	Cont Q	ACC-PP 3.3	CCC
[0407] 总计#	18	45	17
8 细胞/d2	10	0	3
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)

[0408] 实施例16

[0409] 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  $\text{CaCl}_2$ 、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16中。

[0410] 表16.在添加1.7mM  $\text{CaCl}_2$ 、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。

	$\text{CaCl}_2$	ACC-PP	ACC-PP 0.8	PS
[0411] 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)

[0412] 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。

[0413] 实施例17.

[0414] 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号雌鼠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( $\text{NaCO}_3$ )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  $\text{NaCO}_3$ 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17)。

[0415] 表17: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。

	小鼠 1		小鼠 2		小鼠 3-6		
	Cont Q	CCC	ACC-PP	$\text{NaCO}_3$	Cont Q	$\text{NaCO}_3$	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
[0416] 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)

[0417] 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。

[0418] 实施例18. 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。

[0419] 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。

[0420] 实施例19.

[0421] 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中描述的制备稳定的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10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3.4mMACC的情况下。出乎意料地,不需要转移到任何其他培养基来增加孵化的胚细胞的比率。

[0422] 实施例20.

[0423] 在两个不同的实验中,(在每个实验中)将3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17中描述的制备稳定的ACC(用10%三磷酸盐和1%柠檬酸稳定的ACC)。在一个实验中(实验A),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3.4mMACC-PP的SAGE 1-Step™培养基中生长。在第二个实验中(实验B),将来自每只雌鼠的胚胎分离,并且一部分在未处理的卵裂培养基(SAGE)中生长,并且第二部分在补充有3.4mMACC-PP的卵裂培养基中生长。这些实验的结果呈现在图11(实验A)和图12(实验B)中。

[0424] 从实验中可以看出,稳定的ACC的添加对胚胎发育具有积极作用,导致较高的胚泡并且尤其是孵化的胚泡的百分比。出乎意料地,对于两种培养基,不需要转移到任何其他培养基来增加孵化的胚细胞的比率。

[0425] 实施例21. 配制为细胞培养基补充剂的ACC的制备。

[0426] 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18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。

[0427] 表18. 不同ACC组合物中稳定剂的含量

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/HM/P/Pyr/P/S/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

[0429] 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。

[0430] 实施例22. MBA13干细胞(骨髓基质细胞)向成骨细胞的生长

[0431] 材料和方法

[0432] 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 $1 \times 10^4$ 个细胞/孔的浓度接种在96孔板上(第“0”天),使用以50ml:300 $\mu$ l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  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ) 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。

[0433] 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。

[0434] 在第 4 天, 用 ACC 的新鲜制剂交换培养基。

[0435] 平行地, 也来源于 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  $3 \times 10^4$  个细胞/孔的浓度接种在 24 孔板上。接种日被定义为“第 0 天”。

[0436] 在第 2 天, 用以下物质替换孔中的培养基:

[0437] 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 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、B27、 $\text{N}_2$ 、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  $\text{CaCl}_2$  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。

[0438] 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)。

[0439] 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:

[0440] 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。

[0441] 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。

[0442] 结果

[0443] 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。

[0444] 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。

[0445] 在茜素红染色中,钙沉积根据橙红色被检测到。

[0446] 茜素红染色展示了与仅展示微弱信号的补充有CaCl<sub>2</sub>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13A至图13C)。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。

[0447] 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<sub>2</sub>的细胞观察到的形态和数量。在MSC NutriStem® XF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® XF 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。

[0448] 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。

[0449] 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。

[0450] 碱性磷酸酶染色以黑色示出,并且结果呈现在图14A至图14C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。

[0451] 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15A至图15C)。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)。

[0452] MDX细胞系的碱性磷酸酶染色(图15D至图15F)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<sub>2</sub>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。

[0453] 结论

[0454] 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。

[0455] 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<sub>2</sub>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。

[0456] 实施例23-用于促进精子运动性的ACC

[0457] 材料和方法

[0458] ACC悬浮液制备

[0459] 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。

[0460] 精子收集

[0461] 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.71mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.49mM  $\text{MgCl}_2$ 、25.07mM  $\text{NaHCO}_3$ 、3.30mM乳酸钠和1.50mM葡萄糖(10)。同渗容摩应为270mOsmol,且pH为7.55。

[0462] 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°C/min冷却至4°C。

[0463] 上游程序

[0464] 在38°C进行上游程序,将原始精子(10ul)置于ependorf 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。

[0465] 结果

[0466] 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19中呈现了结果。

[0467] 表19.添加和不添加ACC悬浮液34 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (2.6mM元素Ca)的精子的运动性评估。

[0468]

	%运动性	%前向运动性
对照	96 $\pm$ 1.15	55.3 $\pm$ 1.15
ACC(34 $\mu\text{l}/\text{ml}$ :2.6mM元素Ca)	95 $\pm$ 1	70.6 $\pm$ 3.2

[0469] 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。

[0470] 实施例24.在上游实验(swim up experiment)中ACC对精子运动性的影响

[0471] 为了评估ACC对精子运动性的影响,在17 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 和34 $\mu\text{l}/\text{ml}$  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20中。

[0472] 表20:上游实验中ACC对精子运动性的影响(浓度以百万/ml计)

ACC 浓度 (元素钙浓度)	精子浓度( $\times 10^6/\text{ml}$ )		
	实验 1	实验 2	实验 3
对照	142 $\pm$ 7.3	97 $\pm$ 15	207 $\pm$ 12
ACC 17 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (1.3 mM 元素 Ca)	523 $\pm$ 5.7	186 $\pm$ 14	
ACC 34 $\mu\text{l}/\text{ml}$ (2.6 mM 元素 Ca)			1463 $\pm$ 400

[0473] 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。

[0474] 实施例25.上游实验中ACC浓度对精子运动性的影响

[0475] 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21中。

[0476] 表21.上游实验中ACC浓度对精子运动性的影响(浓度以百万/ml计)

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

[0477] 已经注意到,在合成的输卵管液(SOF)溶液中添加17 $\mu$ l/ml ACC悬浮液并在38 $^{\circ}$ C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。

[0478] 实施例26ACC在体外保存卵巢

[0479] 材料和方法

[0480] 卵巢从小鼠(6周龄)收集,切割成0.4mm $\times$ 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,25 $\mu$ g/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PMSG妊娠母马的血清促性腺激素(PMSG)添加到培养皿中。

[0481] 结果

[0482] 从图16A至图16B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。

[0483] 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。

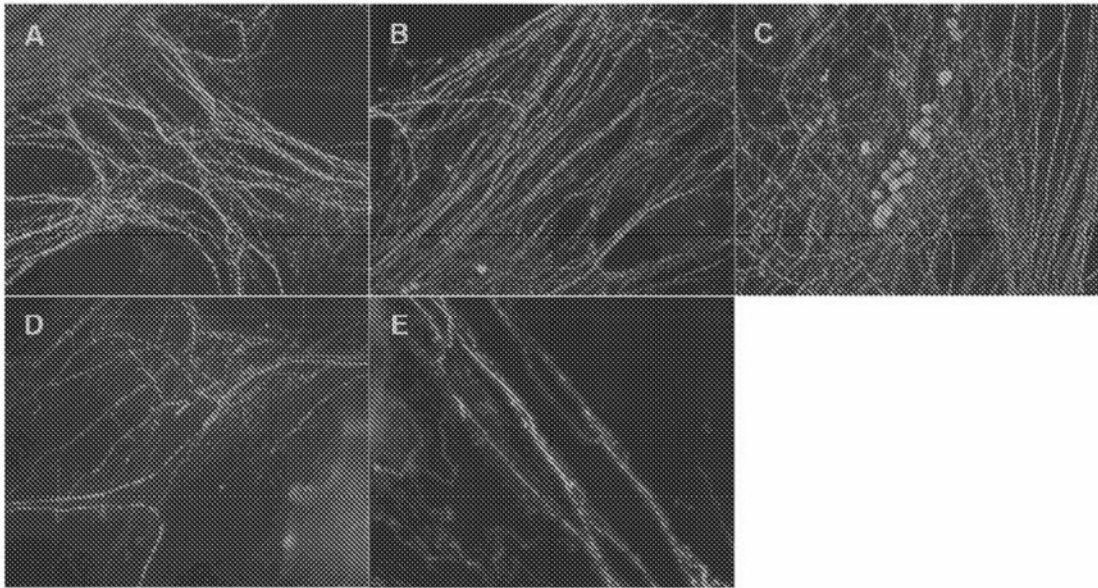


图1

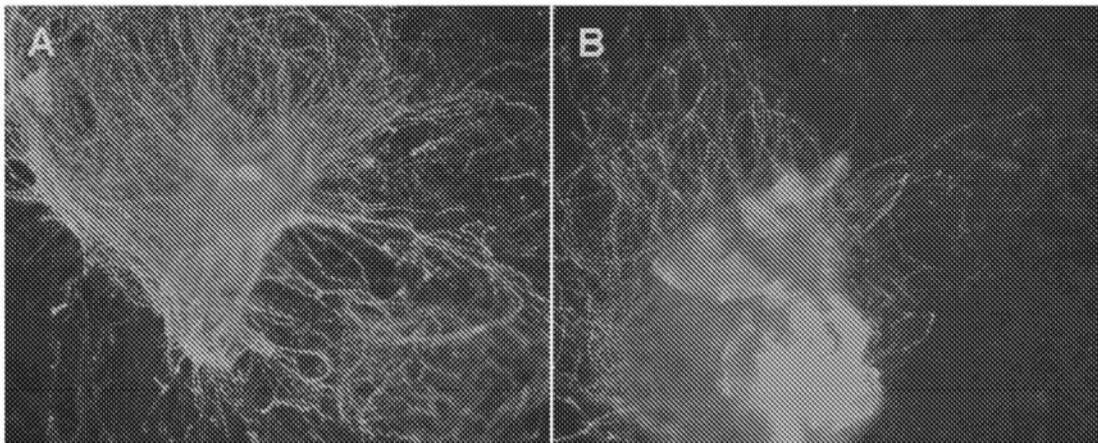


图2

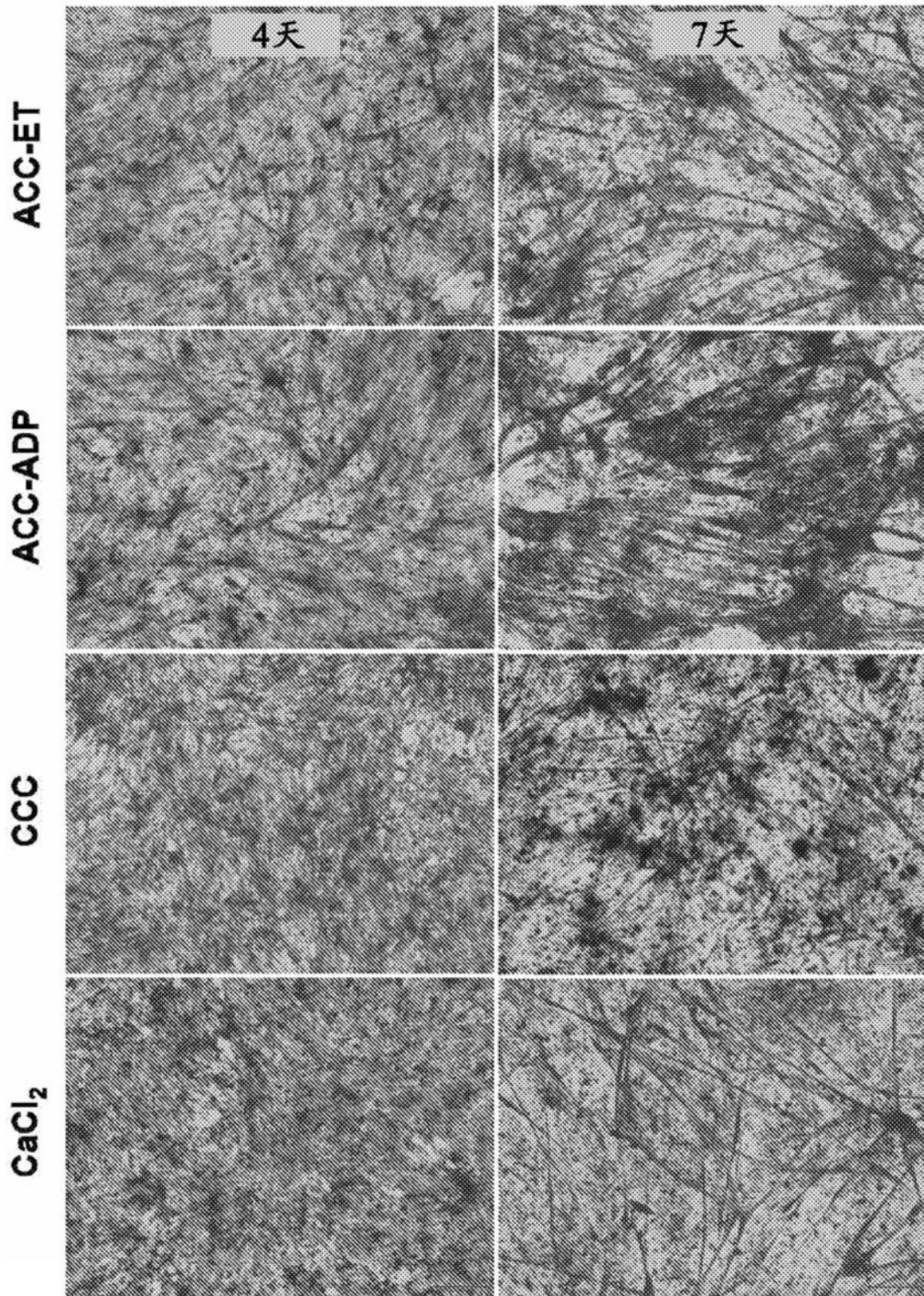


图3

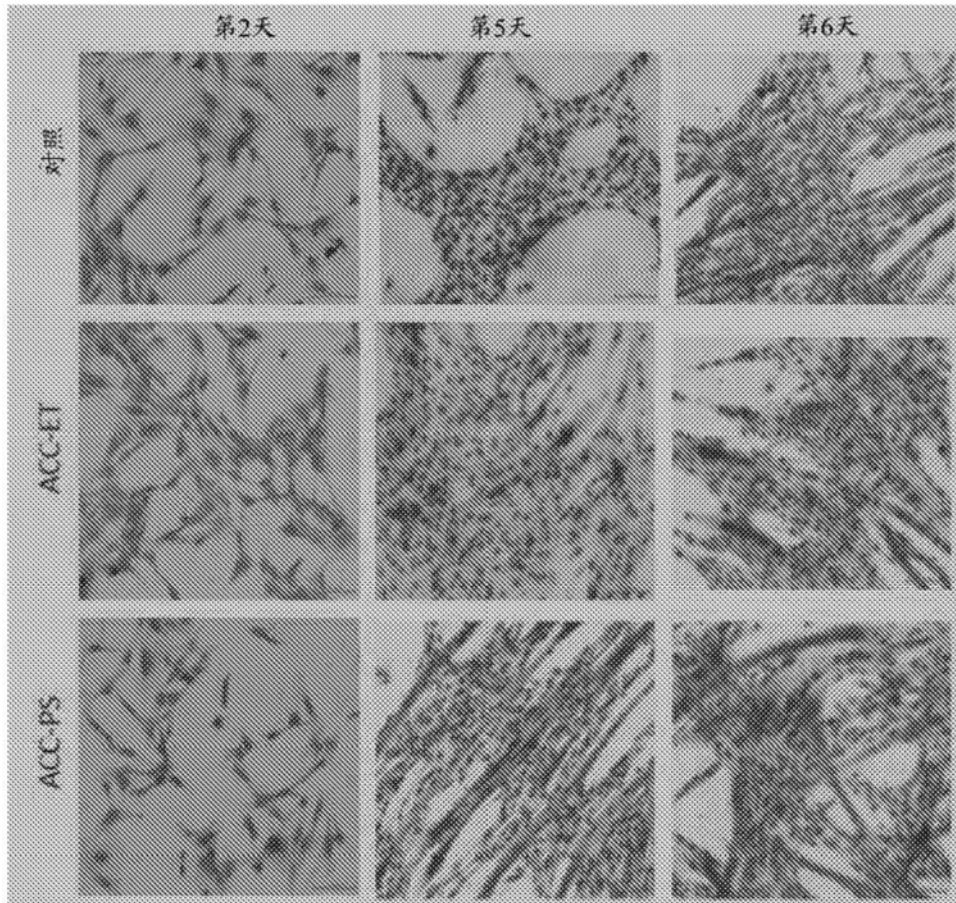


图4

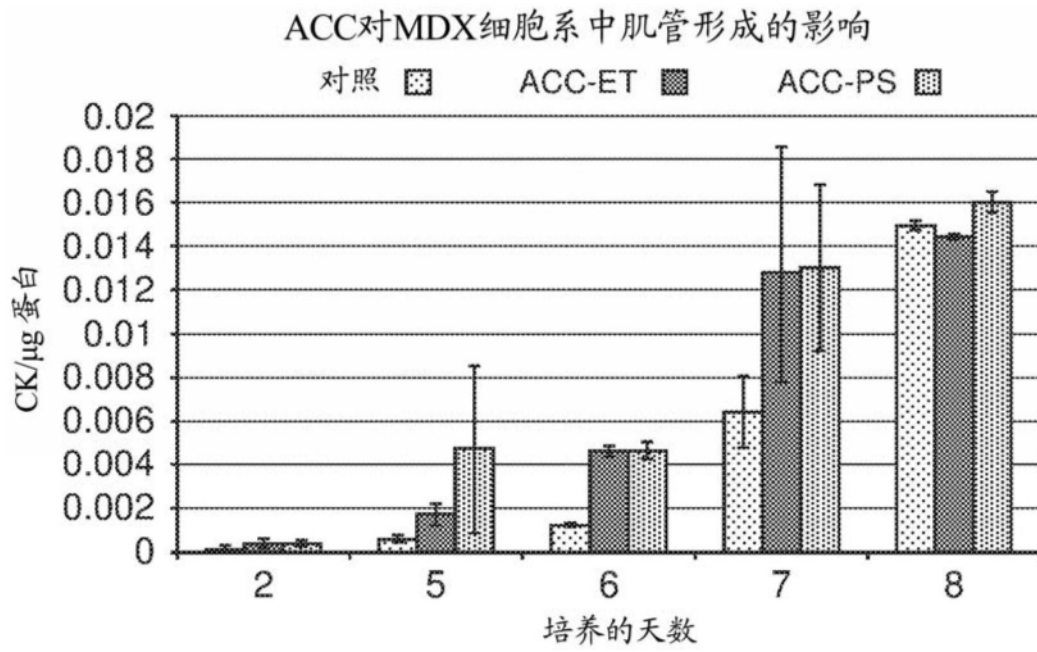


图5

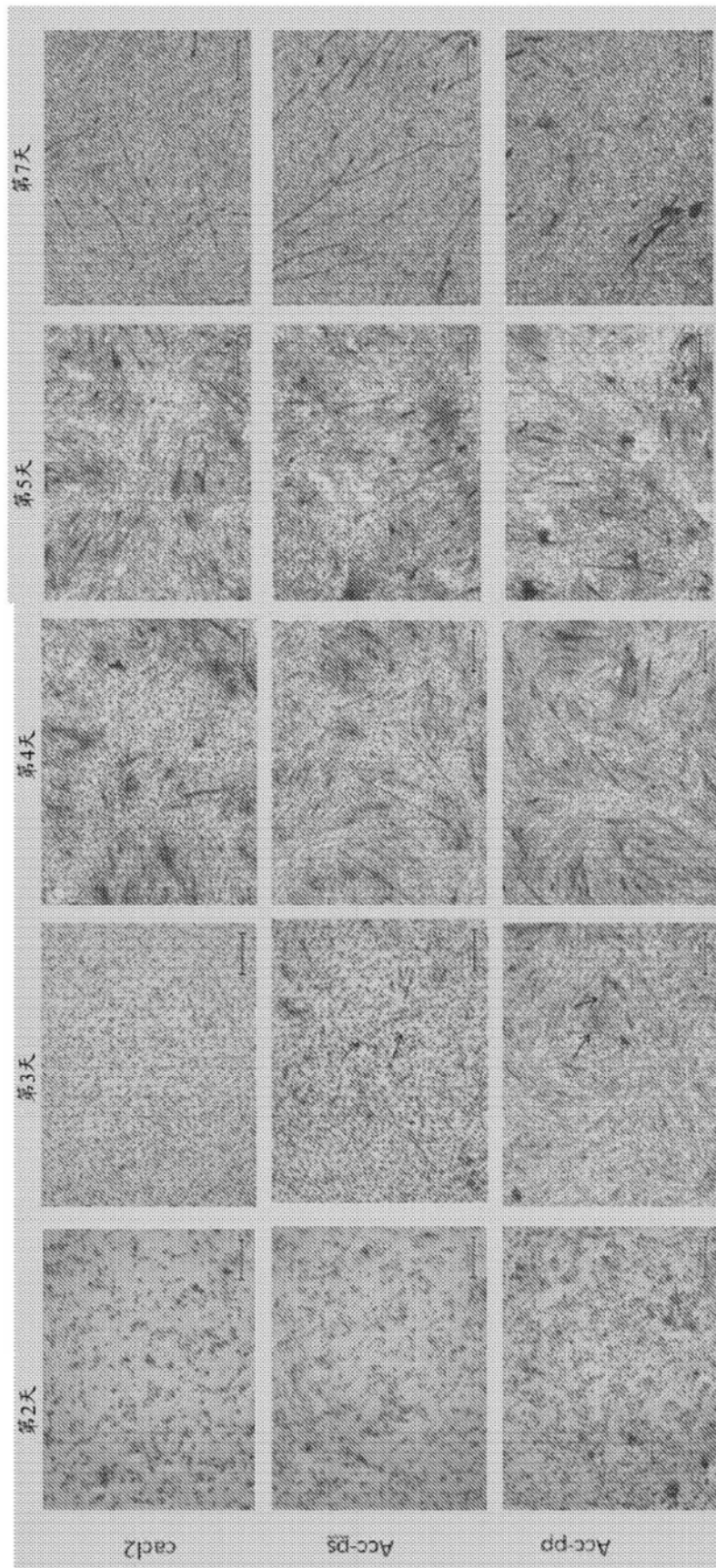


图6

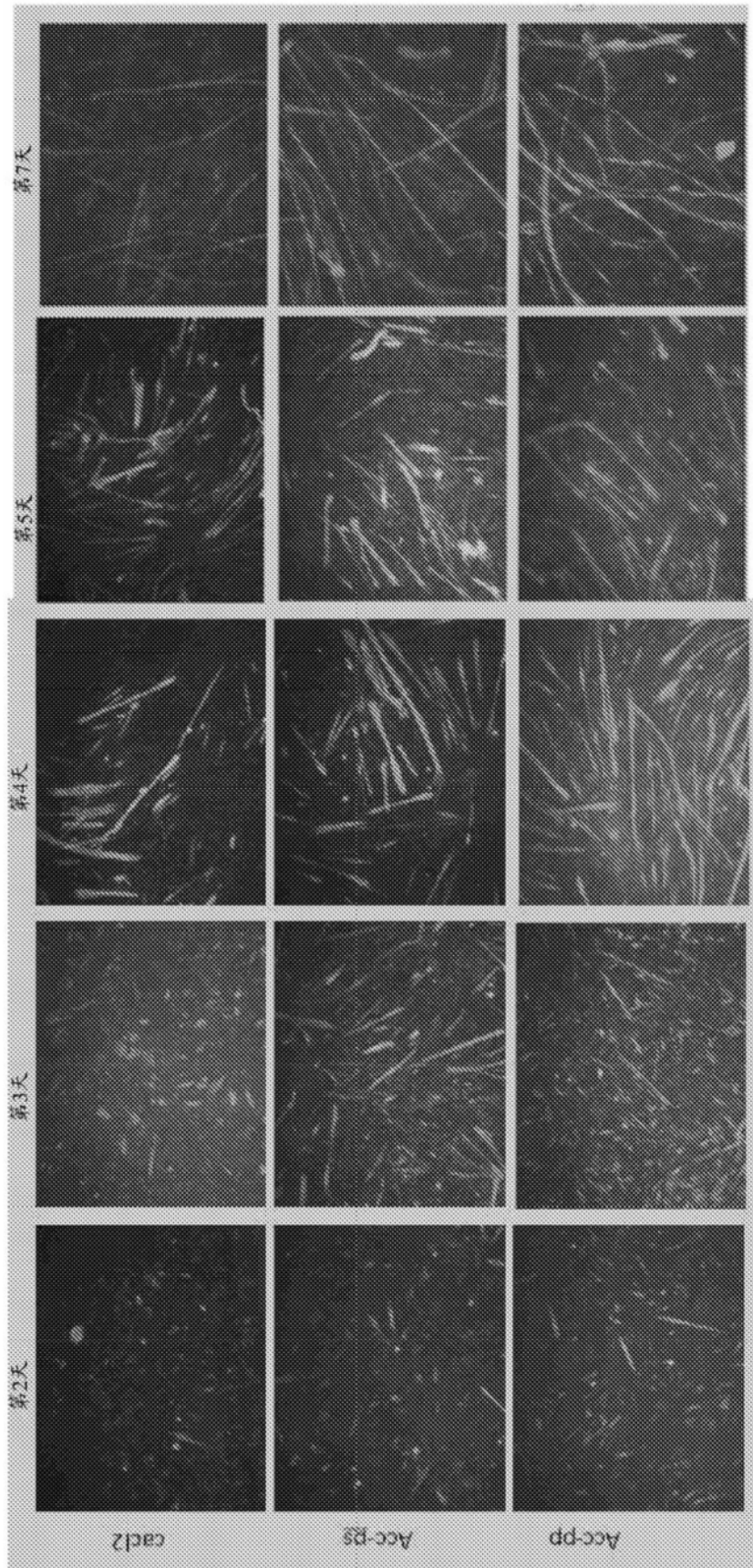


图7

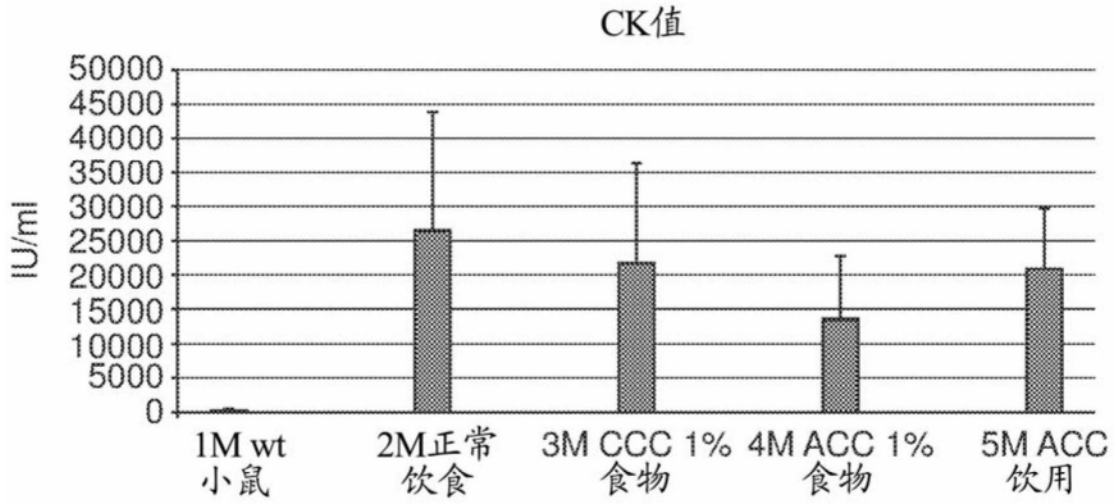


图8

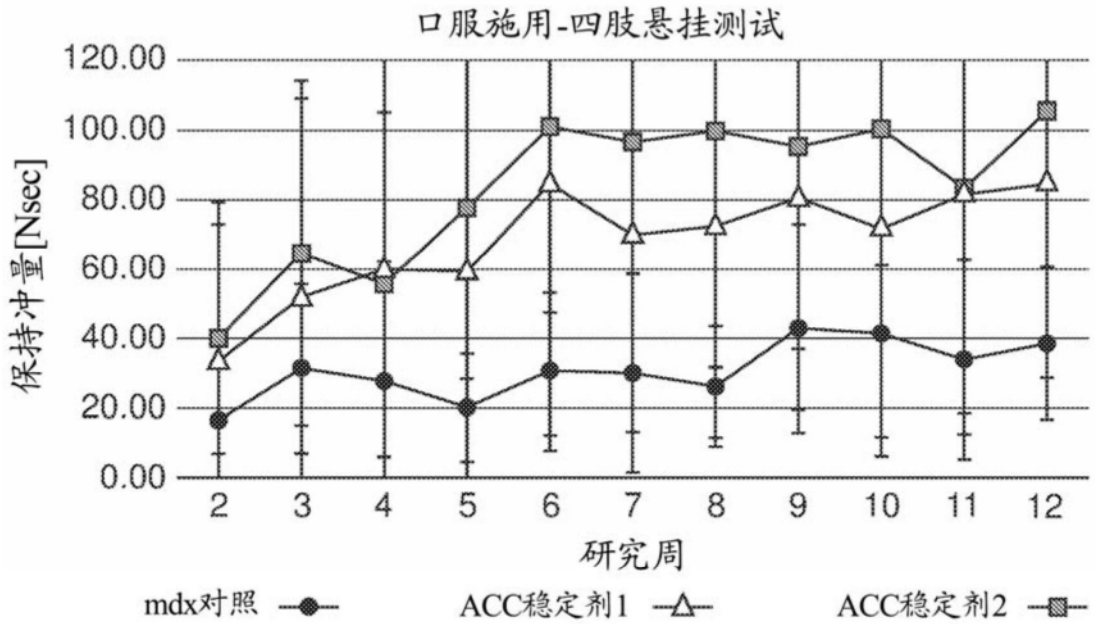


图9

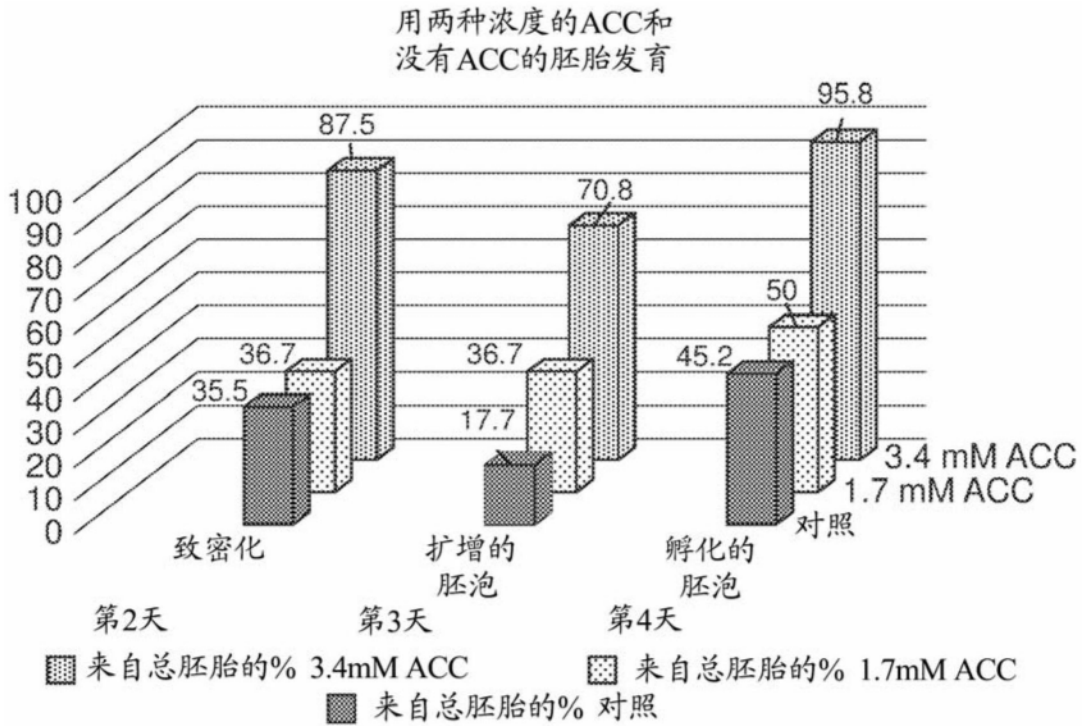


图10

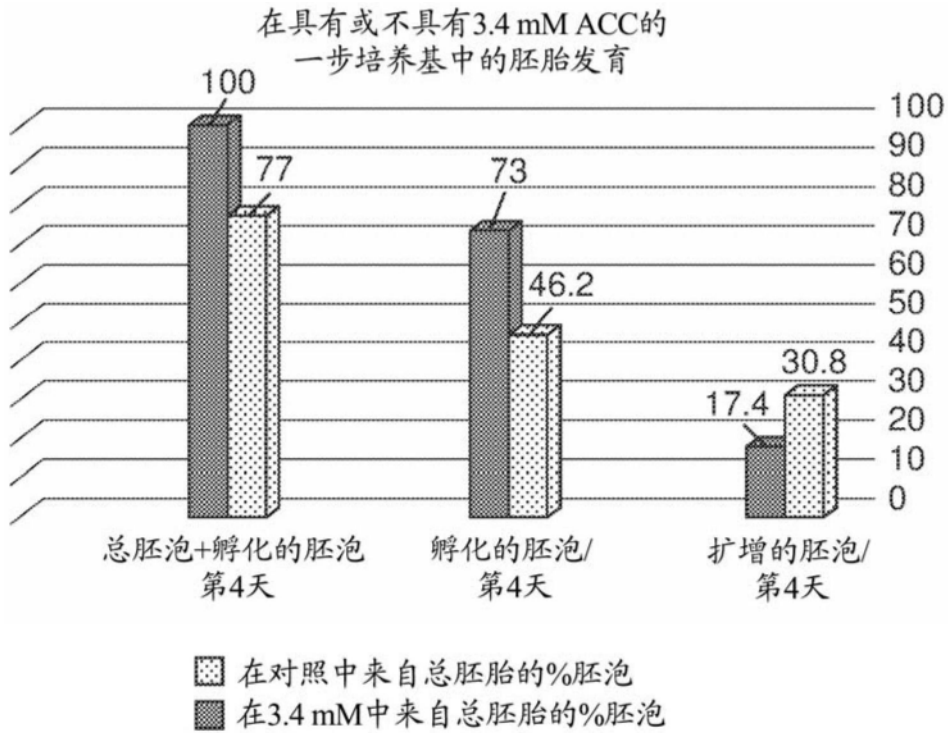


图11

在具有或不具有3.4 mM ACC的卵裂培养基中的胚胎发育

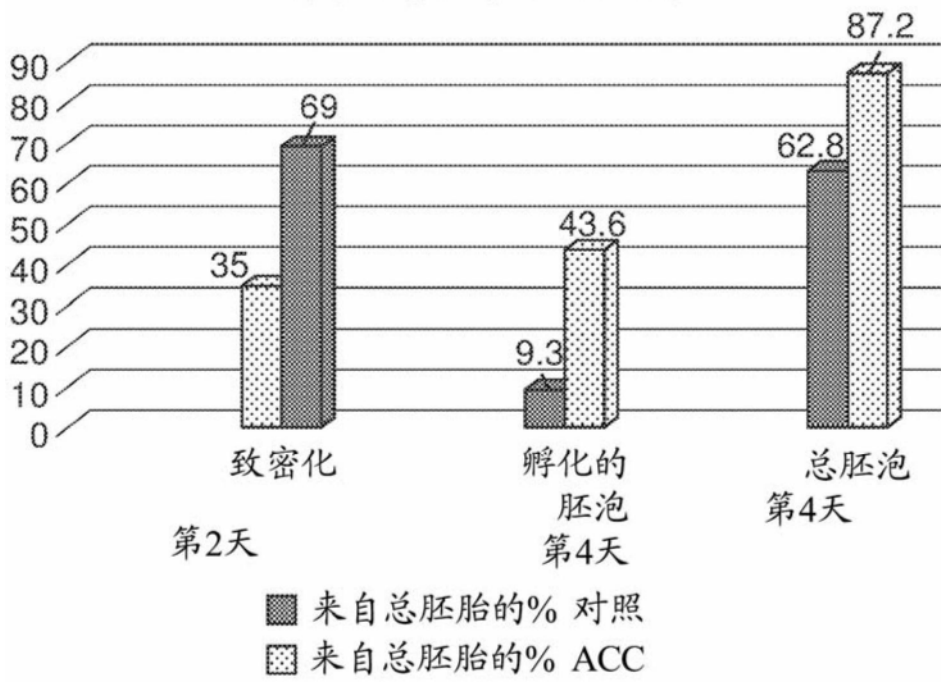


图12

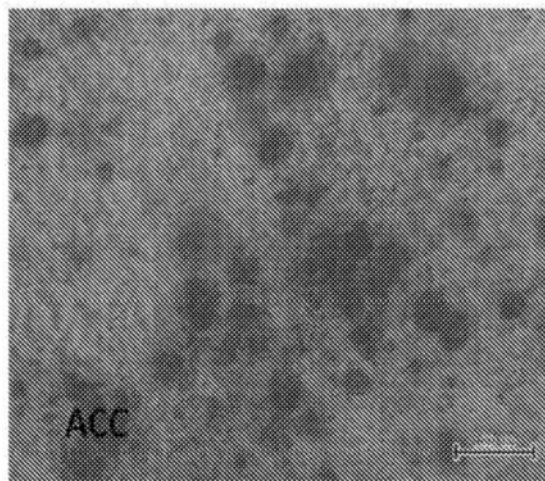


图13A

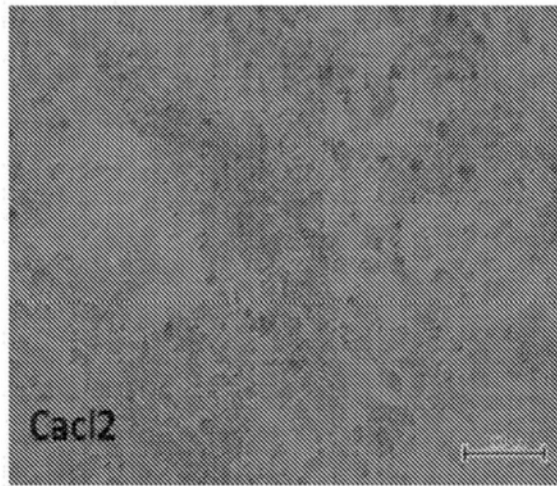


图13B

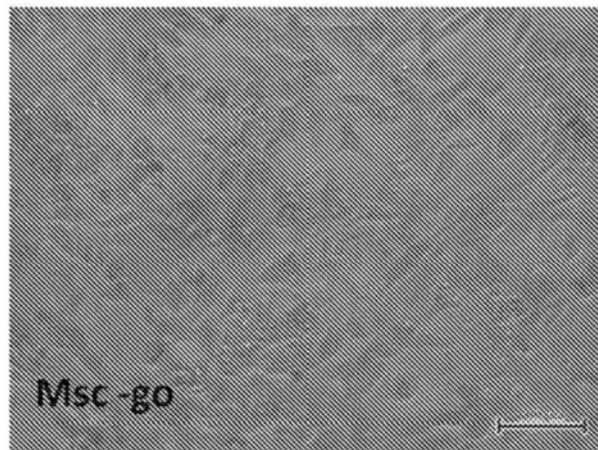


图13C

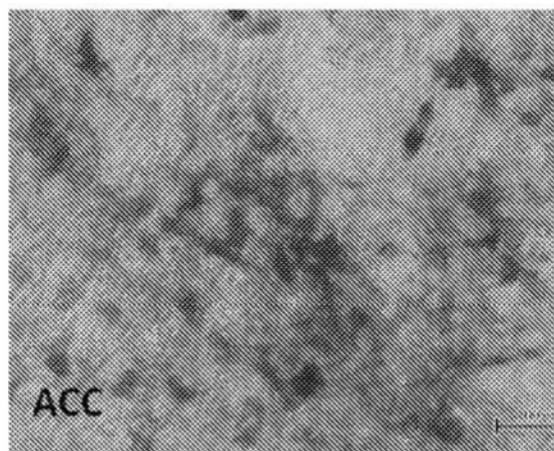


图14A

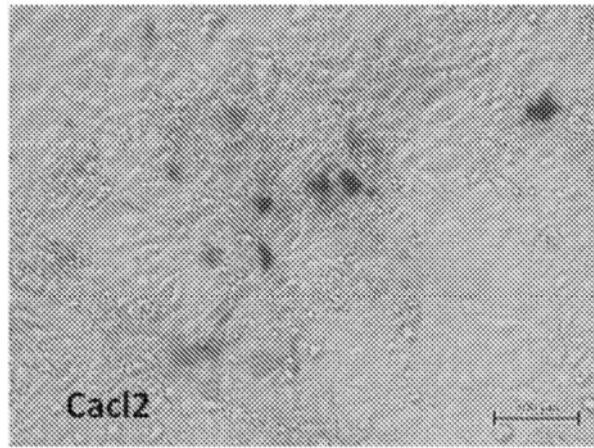


图14B

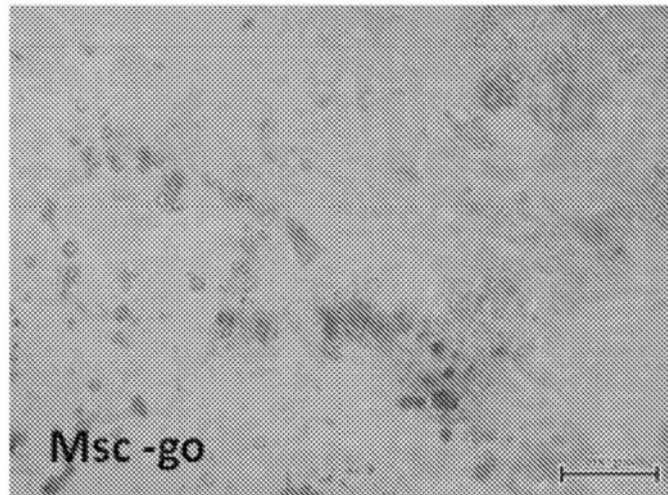


图14C

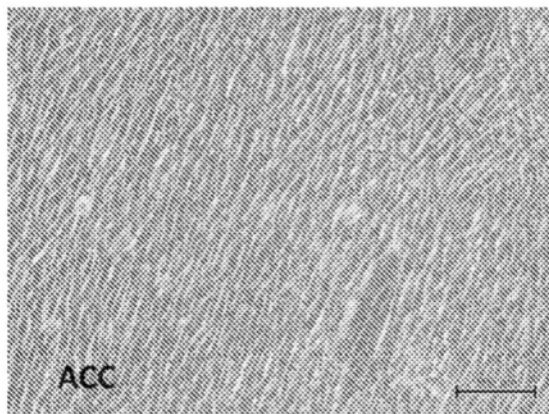


图15A

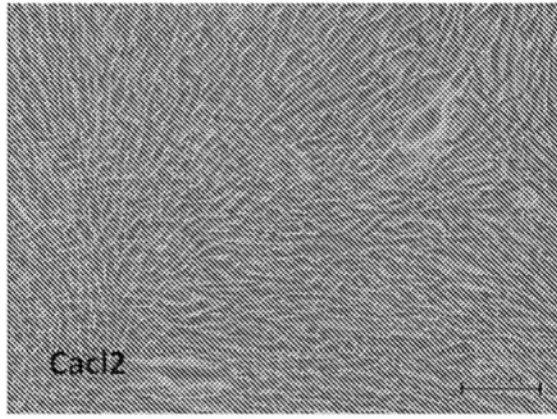


图15B

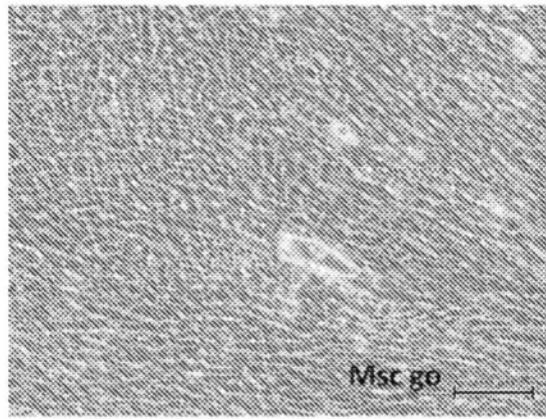


图15C

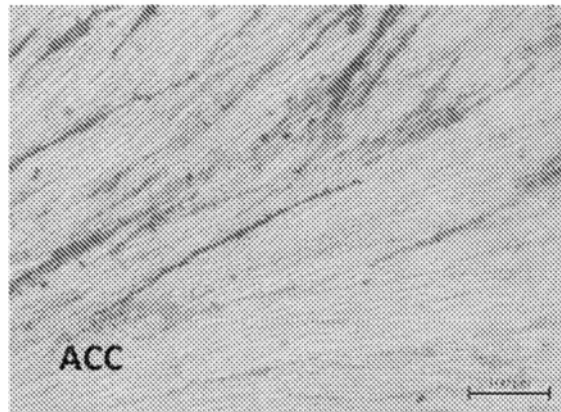


图15D

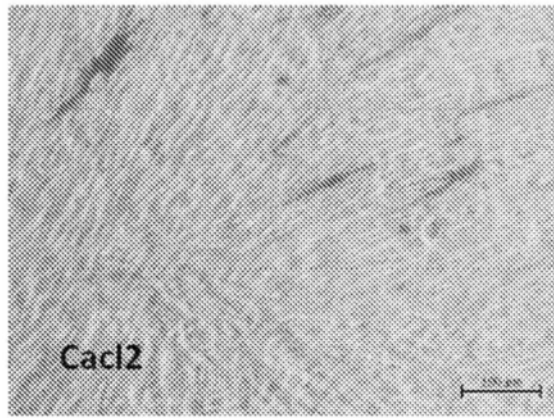


图15E

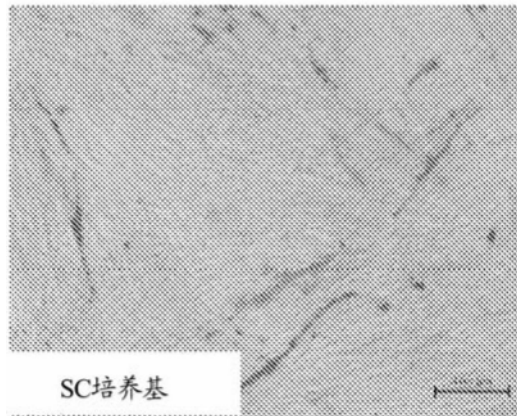


图15F

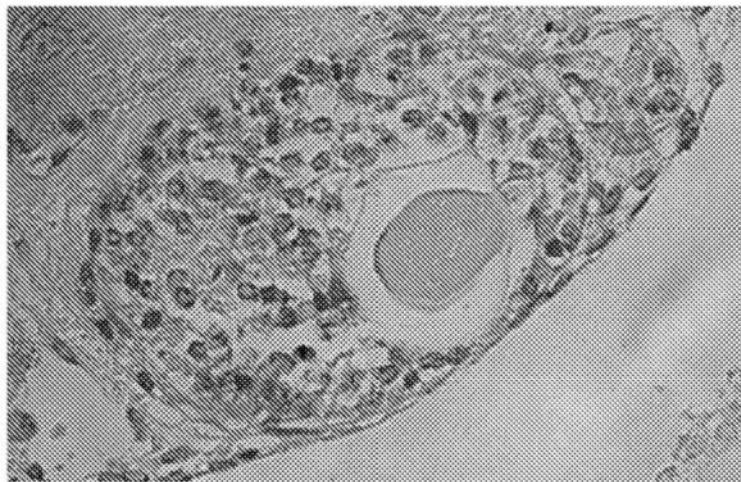


图16A

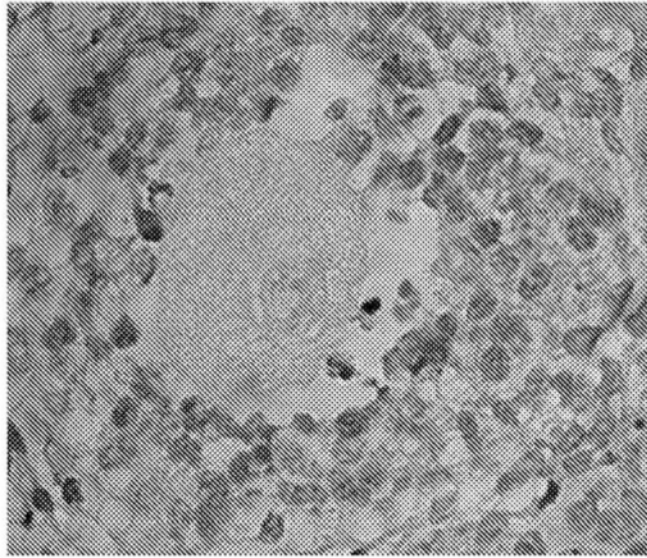


图16B