



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109072186 B

(45) 授权公告日 2023.06.23

(21) 申请号 201780014836.9

(22) 申请日 2017.03.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109072186 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(30) 优先权数据
62/303,979 2016.03.04 US
62/348,116 2016.06.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.03

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/020650 2017.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/152044 EN 2017.09.08

(73) 专利权人 莱兰斯坦福初级大学评议会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 海伦·M·布劳
安得烈·崔·范·何
阿德莱达·R·帕拉

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 31/5575 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)

(56) 对比文件
A.R.PALLA等.Inhibition of
prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH
rejuvenates aged muscle mass and
strength.《science》.2020,第371卷(第6528
期),

审查员 邵文博

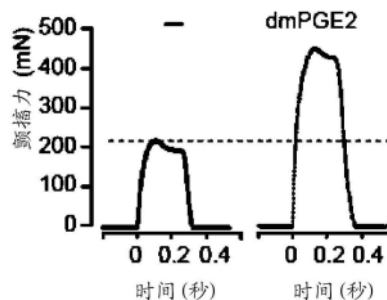
权利要求书1页 说明书39页
序列表4页 附图31页

(54) 发明名称

利用前列腺素E2进行肌肉再生的组合物和方法

(57) 摘要

本文提供了通过将肌细胞暴露于前列腺素E2 (PGE2) 化合物或激活PGE2信号传导的化合物而增殖肌细胞的组合物、方法和试剂盒。还提供了通过给予单独的PGE2化合物或与分离的肌细胞组合的PGE2化合物而用于在患有肌肉萎缩、营养不良和/或损伤的受试者中再生肌肉的方法。可以预防性地给予与分离的肌细胞组合的PGE2化合物来预防肌肉疾病或病症。



1. 减弱前列腺素E2 (PGE2) 分解代谢的化合物在制备用于在有需要的受试者中治疗骨骼肌创伤的药物中的用途, 其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物是15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)抑制剂。

2. 减弱PGE2分解代谢的化合物在制备用于在有需要的受试者中治疗骨骼肌损伤的药物中的用途, 其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物是15-PGDH抑制剂。

3. 减弱PGE2分解代谢的化合物在制备用于在有需要的受试者中治疗骨骼肌萎缩的药物中的用途, 其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物是15-PGDH抑制剂。

4. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述药物用于通过经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心内给药给予所述有需要的受试者。

5. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述药物用于通过急性暴露、间歇暴露、慢性暴露或连续暴露给予所述有需要的受试者。

6. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述骨骼肌创伤、骨骼肌损伤或骨骼肌萎缩是选自以下的一种或多种或者由选自以下的一种或多种导致: 急性肌肉损伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化、远端型肌营养不良、强直性肌营养不良、线粒体性肌病、肌管性肌病、重症肌无力、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁、肌少症、Charcot-Marie-Tooth病、以及面肩肱型肌营养不良。

7. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述骨骼肌创伤、骨骼肌损伤或骨骼肌萎缩是遗传性肌病或由遗传性肌病导致。

8. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述化合物诱导肌肉干细胞群的增殖。

9. 如权利要求8所述的用途, 其中所述肌肉干细胞群包括: 肌源性细胞、卫星细胞、肌肉祖细胞、或以上的组合。

10. 如权利要求4所述的用途, 其中所述药物通过肌内给药施用, 肌内给药包括肌内注射至选自以下的肌肉: 胸肌复合肌、背阔肌、大圆肌、肩胛下肌、肱桡肌、二头肌、肱肌、旋前方肌、旋前圆肌、桡侧腕屈肌、尺侧腕屈肌、指浅屈肌、指深屈肌、拇短屈肌、拇对掌肌、拇收肌、髂腰肌、腰大肌、腹直肌、股直肌、臀大肌、臀中肌、内侧腓绳肌、腓肠肌、外侧腓绳肌、股四头肌、长收肌、短收肌、大收肌、比目鱼肌、胫骨后肌、胫骨前肌、趾长屈肌、趾短屈肌、拇长屈肌、以及姆长伸肌。

11. 如权利要求4所述的用途, 其中所述药物通过肌内给药施用, 肌内给药包括肌内注射至选自以下的肌肉: 手部肌肉、手臂肌肉、足部肌肉、腿部肌肉、胸部肌肉、腹部肌肉、背部肌肉、臀部肌肉、肩部肌肉、头部肌肉、以及颈部肌肉。

12. 如权利要求10所述的用途, 其中所述腓肠肌为内侧腓肠肌、或外侧腓肠肌。

13. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)的化合物、中和肽或中和抗体。

14. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述药物通过经口给药施用。

15. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述药物还包含药学上可接受的载体。

16. 如权利要求1-3任一项所述的用途, 其中所述骨骼肌创伤、骨骼肌损伤或骨骼肌萎缩是脊髓性肌肉萎缩、或者由脊髓性肌肉萎缩导致。

利用前列腺素E2进行肌肉再生的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年3月4日递交的第62/303,979号美国临时申请和2016年6月9日递交的第62/348,116号美国临时申请的优先权,其公开的内容为了所有目的在此通过引用全部并入本文中。

[0003] 在联邦资助的研发下作出的发明权利的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(the National Institutes of Health)第AG020961号政府支持基金下进行的。政府享有本发明的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 在骨骼肌中,衰老引起进行性损伤再生以及肌肉质量、力量和功能的丧失。肌肉功能的丧失是一个主要的公共健康问题,其常常在不断增加的老龄人群中引起严重的运动能力丧失和生活质量受损。肌肉功能下降的一个主要决定因素是衰老过程中急性损伤或创伤后,骨骼肌干细胞(MuSC)再生肌肉的能力受损。还需要加强由于例如,术后固定不动或停用、癌性和HIV性恶病质、肌肉营养不良、急性损伤以及衰老而经历创伤、损伤和/或萎缩肌肉的肌肉再生。常驻型MuSC很少,但其在整个成年期对肌肉(例如骨骼肌、平滑肌和心肌)的维持和修复是至关重要的。随着衰老,功能性干细胞的数目减少,因而增加提升MuSC数目和功能的需要增强。

[0007] 前列腺素E2(PGE2),也称为地诺前列酮(dinoprostone),已被用于不同的临床环境中,包括诱导女人分娩和增强造血干细胞移植。PGE2可用作抗凝剂和抗血栓形成剂。PGE2作为脂质介质可以缓解炎症的作用也广为人知。COX-1和/或COX-2的抑制剂——非甾体抗炎药(NSAID),主要是经PGE2生物合成通过抑制前列腺素而抑制炎症。

[0008] PGE2通过环氧合酶(COX)和前列腺素E合成酶由花生四烯酸合成。PGE2的水平受PGE2降解酶——15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)的生理调控。15-PGDH催化PGE2 15-OH失活转化为15-酮基。

[0009] 本领域仍然需要用于再生或复原有需要的受试者中创伤、受损、功能异常和/或萎缩的肌肉的有效疗法。本发明满足该需要且还提供了优势。

[0010] 发明概述

[0011] 在本发明的一个方面,本文提供了刺激分离的肌肉干细胞群增殖的方法。所述方法包括用选自以下的化合物培养分离的肌细胞群:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及以上的组合。

[0012] 在本发明的第二个方面,本文提供了组合物,其包含分离的肌细胞群和选自以下的化合物:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及以上的组合。

[0013] 在本发明的第三方面,本文提供了试剂盒,其包含组合物和说明书,所述组合物包含分离的肌细胞群和选自以下的化合物:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及

以上的组合。

[0014] 在第四个方面,本文提供了用于在患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的受试者中再生肌细胞群的方法。所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的化合物和药学可接受的载体来增加所述受试者的肌细胞群和/或增强所述受试者的肌肉功能,所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及以上的组合。

[0015] 在第五个方面,本文提供了用于在有需要的受试者中预防或治疗与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的方法。所述方法包括给予所述受试者以下物质来预防或治疗所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病:(i) 治疗有效量的化合物和药学可接受的载体,所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及以上的组合,以及(ii)分离的肌细胞群。

[0016] 本发明的其他目的、特征和优势通过以下详细描述和附图对于本领域技术人员是显而易见的。

[0017] 附图简要说明

[0018] 图1A-1H显示在体外短暂PGE2处理促进年轻MuSC增殖。图1A:通过ELISA测定的年轻胫骨前肌(TA)肌肉损伤(虎蛇毒素(notexin), NTX)后的PGE2水平;对照为未受损伤的对侧TA;(n=4只小鼠/时间点)。图1B:通过RT-qPCR测定的虎蛇毒素损伤后MuSC的PGE2合成酶(Ptges2和Ptges)的表达,(n=3只小鼠/时间点)。图1C:用媒介物(-)或PGE2(10ng/ml)处理24小时后,接着在水凝胶上培养至第7天(急性处理)MuSC数目增加;(n=12只小鼠,于4个独立的实验中)。图1D:在EP4拮抗剂(ONO-AE3-208, 1 μ M)不存在或存在下用媒介物(-)或PGE2(10ng/ml)短暂处理24小时后MuSC数目增加;(n=9只小鼠,在3个独立的实验中测定)。图1E-1G:无EP4的MuSC增殖。EP4^{f/f}(无)MuSC用编码GFP荧光素酶的慢病毒载体转导,并用编码Cre(+Cre)或无Cre(-Cre;空载体)的慢病毒载体处理以删除EP4等位基因。随后,用媒介物(-)或PGE2(10ng/ml)处理MuSC 24小时,并在水凝胶上培养3天。图1E:描述无EP4的MuSC分析的示意图。图1F:无EP4的MuSC数目;(n=6只小鼠,于2个独立的实验中)。图1G:代表性图。比例尺=40 μ m;GFP,绿色;mCherry,红色。图1H:每两天用媒介物(-)或PGE2(10ng/ml)处理的活性炭吸附处理培养基中培养7天后,水凝胶上的MuSC数目;(n=3只小鼠,具有3个技术重复)。*P<0.05,**P<0.001,***P<0.0005,****P<0.0001。对于多重比较,利用采用Bonferroni校正的ANOVA检验(图1A、1B、1D和1F);成对t-检验(图1C);曼-惠特尼检验(图1H)。均值+s.e.m,n.s.,不显著的。

[0019] 图2A-2J显示衰老MuSC对PGE2的异常反应。图2A:通过ELISA测定的衰老TA损伤(虎蛇毒素,NTX)后的PGE2水平;对照为未受损伤的对侧TA;(n=4只小鼠/时间点)。图2B:通过ELISA测定的未受损伤的幼龄(n=7只小鼠)和老龄(n=5只小鼠)小鼠TA的PGE2水平。图2C:显示PGE2通过降解酶15-PGDH分解代谢为其失活的PGE代谢物——13,14-二羟基-15-酮PGE2(PGEM)的示意图。图2D:通过质谱定量的PGEM水平;(n=4只小鼠/年龄组)。图2E:PGE2降解酶15-PGDH(Hpgd)的表达;(n=3只小鼠,采用2个技术重复)。图2F:用媒介物(-)、PGE2(10ng/ml)或15-PGDH抑制剂SW033291(1 μ M;SW)急性处理24小时后第7天测定的衰老MuSC数目增加;(n=15只小鼠,于5个独立的实验中)。图2G:每两天用媒介物(-)或PGE2(10ng/

m1)处理的活性炭吸附处理培养基中培养7天后,水凝胶上的衰老MuSC数目;(n=3只小鼠,具有3个技术重复)。图2H:描述PGE2对MuSC影响的示意图。PGE2通过EP4受体/cAMP(环状AMP)信号传导通路起作用来促进增殖。在衰老MuSC中,通过PGT(前列腺素转运蛋白)的胞内转运后,PGE2分解代谢通过15-PGDH介导为失活形式——PGEM。图2I:微孔板中对照(左图)和用PGE2急性处理后(右图)的衰老MuSC的克隆通过延时显微镜检查追踪48小时的轨迹。通过不同的颜色显示原始细胞和其每一个新生后代的轨迹。图2J:通过延时显微镜检查追踪的克隆中对照(左图,n=32个克隆)和用PGE2急性处理后(右图,n=45个克隆)的衰老MuSC活细胞计数(数目)变化。在所有时间点每代(G1-G6)中活细胞的比例显示为标准化为100个单一MuSC起始群的细胞数目。活细胞计数的百分比增加为4.0%(对照)和5.4%(PGE2-处理)(上图)。通过延时显微镜检查追踪的克隆中对照(左图)和用PGE2急性处理后(右图)的衰老MuSC死细胞计数(数目)变化。在所有时间点每代(G1-G6)中死细胞的比例显示为标准化为100个单一MuSC的起始群的细胞数目。死细胞计数的百分比增加为1.0%(对照)和0.1%(PGE2-处理)(下图)。 $*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.0005$ 。对于多重比较,利用采用Bonferroni校正的ANOVA检验(图2A和2F);曼-惠特尼检验(图2B、2D、2E和2G)。均值±s.e.m.,n.s.,不显著的。

[0020] 图3A-3D显示在体内急性PGE2处理促进MuSC移植和再生。图3A:用媒介物(-)或PGE2急性处理后,培养的分离自转基因小鼠的GFP/luc标记的年轻MuSC(250个细胞)的移植,如图1C中所描述。移植示意图(上图)。非侵入性生物发光成像(BLI)信号测量为各TA的辐射度;(n=5只小鼠/条件)(下图)。图3B:移植培养的用Cre(+Cre)或无Cre(-Cre;空载体)处理的GFP/luc标记的EP4^{f/f} MuSC(1,000个细胞),以删除EP4等位基因。用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导EP4^{f/f} MuSC,用于BLI。移植示意图(上图)。移植后(n=5只小鼠/条件)(下图)的BLI信号。图3C:与媒介物(-)或dmPGE2共同注射的新鲜分选的古FP/luc标记的年轻MuSC(250个细胞)的移植。移植示意图(上图)。移植后的BLI信号;(对于媒介物和dmPGE2处理,分别为n=4和n=5只小鼠)。图3D:与媒介物(-)或dmPGE2共同注射的古FP/luc标记的衰老MuSC(250个细胞)的移植;(n=3只小鼠/条件)(下图)。用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导衰老MuSC,用于BLI。移植示意图(上图)。移植后的BLI信号,表示为平均辐射度($\text{p s}^{-1}\text{cm}^{-2}\text{sr}^{-1}$)。每种条件的代表性BLI图。比例尺=5mm(图3A-3D)。数据代表两个独立的实验。 $*P<0.05$, $**P<0.001$,和 $***P<0.0005$ 。对于组比较,采用ANOVA检验,且通过费歇尔检验确定终点的显著性差异。均值+s.e.m。

[0021] 图4A-4P显示肌肉注射单独的PGE2促进MuSC扩增,改善再生和增加力量。年轻的(图4A-4D):心脏毒素(CTX)损伤后48小时,用媒介物(-)或dmPGE2注射幼龄小鼠的TA肌肉;(n=3只小鼠/条件)。图4A:实验程序的示意图(上图)。心脏毒素损伤后14天染色的代表性TA横截面(下图),其中核(DAPI;蓝色)、层粘连蛋白(绿色)和PAX7(红色)。箭头指示PAX7⁺ MuSC。比例尺=40 μm 。图4B:通过免疫荧光测定的来自幼龄小鼠的TA横截面中表达PAX7的卫星细胞/100根纤维的内源MuSC增加。图4C:使用用于肌纤维分析的Baxter算法定量媒介物(-,开放的白色条)和dmPGE2(填充的蓝色条)处理的年轻TA的肌纤维横截面面积(CSA)。图4D:小(<1,000 μm^2 CSA)和大(>1,000 μm^2 CSA)肌纤维的分布。(图4E-4G)通过Pax7-荧光素酶测定的内源MuSC增加。用三苯氧胺(TAM)经腹膜内处理Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠,3天后TA经过心脏毒素(CTX)损伤、注射媒介物(-)或dmPGE2,并通过BLI监测;(n=3只小鼠/条

件)。图4E:实验程序的示意图。图4F:BLI ($n=3$ 只小鼠/条件)。图4G:代表性BLI图。比例尺=5mm。衰老的(图4H-4K):在体内心脏毒素(CTX)损伤后48小时用媒介物(-)或dmPGE2处理对老龄小鼠的TA进行治疗;($n=3$ 只小鼠/条件)。图4H:实验程序的示意图(上图)。心脏毒素损伤后14天染色的代表性TA横截面(下图),其中核(DAPI;蓝色)、层粘连蛋白(绿色)和PAX7(红色)。箭头指示PAX7⁺肌肉干细胞。比例尺=40 μ m。图4I:图4B中所示老龄小鼠的内源MuSC增加。图4J:图4C所示衰老TA的肌纤维横截面面积(CSA)。图4:图4D所示衰老TA的CSA分布。(图4L-4P)下坡式跑步机跑步后在老龄小鼠体内测量的肌肉收缩力的力增加。使小鼠经过2周连续的20°下坡式跑步机跑步,并在第5周测定力。在第1周期间,老龄小鼠的中间和侧面腓肠肌(GA)注射媒介物(-)或dmPGE2。媒介物(-)处理或dmPGE2处理分别采用 $n=10$ 或8个生物重复,其中每个具有5个技术重复。图4L:实验示意图。代表性颤搐力(图4M)和强直收缩力(图4N)。通过将力标准化为生理横截面面积(PCSA)来计算比肌肉颤搐力(图4O)和比肌肉强直收缩力(图4P)。成对t检验(图4B、4D、4I和4K);对于组比较采用ANOVA检验,且通过费歇尔检验确定终点的显著性差异(图4F);曼-惠特尼检验(图4O和4P)。* $P<0.05$,** $P<0.001$ 和**** $P<0.0001$ 。均值+s.e.m。

[0022] 图5A-5K显示PGE2促进MuSC扩增。图5A:相比对侧未受损伤的对照,通过ELISA测定的低温损伤后第3天幼龄小鼠后肢肌肉的胫骨前肌(TA)的PGE2水平;($n=4$ 只小鼠/时间点/条件)。图5B:用PGE2(10ng/ml)或媒介物(-)处理24小时(d0-d1)后的1小时期间,用EdU(红色)标记且染色成肌素(绿色)的分裂的肌肉干细胞(MuSC)的代表性图。比例尺代表40 μ m。图5C:用EDU标记的分裂的MuSC的百分比,如(b)中所示;($n=6$ 只小鼠,具有3个技术重复,于两个独立的实验中)。图5D:用媒介物(-)或所示剂量的PGE2(1-200ng/ml)处理后,通过代谢活力检测VisionBlue测量的增殖增加;($n=6$ 只小鼠,具有3个技术重复,于两个独立的实验中)。图5E:用媒介物(-)或PGE2处理24小时后MuSC的前列腺素受体(Ptger 1-4)的表达;($n=3$ 只小鼠,具有2个技术重复)。图5F:相对于未处理对照(-),PGE2处理1小时后MuSC的cAMP水平增加;($n=6$ 只小鼠,具有3个技术重复,于2个独立的实验中测定)。图5G-5H:用媒介物(-)或PGE2处理24小时后MuSC的Pax7(图5G)和成肌素(图5H)的表达;($n=3$ 只小鼠,具有2个技术重复)。图5I-5J:用编码GFP/荧光素酶的慢病毒载体转导EP4^{f/f} MuSC,并用编码Cre(+ Cre)或无Cre(-Cre;空载体)的慢病毒载体进行处理来删除EP4等位基因。柱状图显示了+ CreMuSC(图5I)和GFP/Luc⁺MuSC(图5J)的百分比。图5K:在每两天补充媒介物(-)或PGE2(10ng/ml)的包含活性炭吸附处理胎牛血清的成肌细胞培养基中培养7天后,水凝胶上的MuSC的代表性图。比例尺代表40 μ m。* $P<0.05$,** $P<0.001$,*** $P<0.0005$ 。成对t检验(图5A、5E、5G和5H);曼-惠特尼检验(图5C)。均值+s.e.m.n.s.,不显著的。

[0023] 图6A-6C显示了年轻和衰老肌肉的质谱分析检测前列腺素和PGE2代谢物。图6A:分析的前列腺素(PGE2、PGF2 α 和PGD2)和PGE2代谢物(15-酮PGE2和13,14-二氢-15-酮PGE2)的化学结构、化学式、精确分子量和分子量。所有复合标准品均添加了内标PGF2 α -D9和PGE2-D9。图6B:通过稀释储备溶液至0.1ng/ml至500ng/ml的终浓度来制备液相色谱-电喷雾离子阱-串联质谱(LC-ESI-MS/MS)分析的校准标准品。给出了每个标准品的标准曲线方程式和相关系数。图6C:代表性色谱图。单独的峰显示分析的前列腺素及其代谢物的极好的色谱分辨率。Cps,计数/秒。

[0024] 图7A-7G显示衰老MuSC响应PGE2处理而增加增殖和细胞存活。图7A-7C:对于年轻

和衰老MuSC,通过qRT-PCR测量的mRNA水平以Gapdh标准化;(n=3只小鼠,具有2个技术重复)。图7A:Slco2a1基因编码的前列腺素转运蛋白(PGT)。图7B:PGE2合成酶,Ptges和Ptges2。图7C:基因Ptger1-4编码的EP1-4受体。图7D:用媒介物(-)处理或PGE2处理24小时后MuSC的Pax7mRNA水平;(n=3只小鼠,具有2个技术重复)。图7E:用媒介物(-;上图)或PGE2(下图)急性处理后通过延时显微镜检查追踪的单个衰老MuSC克隆。对于每个克隆,显示了48小时定时拍摄轨迹后得到的活细胞(开放柱)和死细胞(黑色柱)数目。图7F:通过延时显微镜检查评估追踪媒介物(-)或短暂PGE2处理的活的衰老MuSC在48小时时间段的增殖曲线。图7G:衰老MuSC凋亡膜联蛋白V⁺的流式细胞术分析,用媒介物(-)或PGE2处理24小时后且在水凝胶上生长7天后进行分析;(n=9只小鼠,于3个独立的实验中)。以 $\alpha=0.05$ 水平的曼-惠特尼检验(图7A-7D)和成对t检验(图7G)。均值+s.e.m.n.s.,不显著的。

[0025] 图8A-8B显示用于肌肉横截面面积的肌纤维分析的Baxter算法。图8A:心脏毒素(CTX)损伤后48小时用媒介物(-)或PGE2在体内治疗的幼龄小鼠的胫骨前肌肌纤维的代表性横截面图。图显示染色,其中层粘连蛋白(绿色)和DAPI(蓝色)。图8B:通过用于肌纤维分析的Baxter算法分析来自图8A的相应分割图,以测定损伤后第14天肌纤维(下图)横切面的横截面面积(CSA)。比例尺代表40 μ m。

[0026] 图9A-9G显示删除MuSC中的PGE2受体EP4降低损伤后骨骼肌的再生和力量。用三苯氧胺处理的Pax7特异性EP4条件性敲除小鼠(Pax7^{CreERT2};EP4^{f1/f1}) 在虎蛇毒素损伤后6天(图9C-9D)、21天(图9B和9E)和14天(图9F和9G)测定的胫骨前肌(TA);(n=3只小鼠/条件)。图9A:实验示意图。图9B:来自损伤后的对照或EP4KO小鼠的分选的MuSC(α^{7+} CD34⁺lin⁻)中Ptger4(EP4受体)的表达。图9C:代表性TA横切面。DAPI,蓝色;胚胎肌球蛋白重链(eMyHC),红色。比例尺=40 μ m。图9D:eMyHC纤维的百分比。图9E:对照和Pax7特异性EP4敲除TA的肌纤维横截面面积(CSA)。虎蛇毒素损伤后第14天的肌肉颤搐力(图9F)和(图9G)肌肉强直收缩力。曼-惠特尼检验(图9B、9C、9F和9G);对于组比较,ANOVA检验;且通过费歇尔检验每个二进数(bin)的显著性差异(图9E)。*P<0.05,***P<0.0005,和****P<0.0001。均值+s.e.m。

[0027] 图10A-10C显示在再生的较早时间点,肌肉中内源性PGE2信号传导的阻断减少再生和力量。在心脏毒素损伤后,用媒介物(-)或NSAID(吲哚美辛)注射胫骨前肌(TA)后,通过非侵入性生物发光成像(BLI)测定的三苯氧胺(TAM)处理的Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠的内源MuSC;(n=3只小鼠/条件)。图10A:实验方案。图10B:BLI;(n=3只小鼠/条件)。图10C:虎蛇毒素损伤后第14天的肌肉颤搐力(对于媒介物处理,n=8;对于NSAID处理,n=10)。采用ANOVA检验进行组比较,且通过费歇尔检验终点的显著性差异(图10B)。曼-惠特尼检验(图10C)。*P<0.05,**P<0.001,***P<0.0005,和****P<0.0001。均值+s.e.m。

[0028] 发明详述

[0029] I. 前言

[0030] 本发明部分是基于发现前列腺素E2(PGE2)能够改善肌细胞增殖和功能。可将PGE2单独或与分离的肌细胞组合用于修复由于损伤、萎缩或疾病而造成的肌肉损害。事实上,施用后,PGE2-处理的肌细胞显示增加的肌肉再生和改善的肌肉功能。由此,本文提供了新的治疗方法、组合物和试剂盒来促进肌肉再生和创伤、损伤或萎缩肌肉的恢复。

[0031] II. 概述

[0032] 实施本发明利用分子生物学领域的常规技术。公开在本发明中使用的一般方法的

基础文本包括Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3rd ed. 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994)。

[0033] 对于核酸,大小以千碱基(kb)、碱基对(bp)或核苷酸(nt)示出。单链DNA和/或RNA的大小可以以核苷酸给出。这些为来自琼脂糖或丙烯酰胺凝胶电泳、来自测序的核酸或来自发表的DNA序列的估算值。对于蛋白质,大小以千道尔顿(kDa)或氨基酸残基数目示出。蛋白质大小为来自凝胶电泳、来自测序的蛋白质、来自推导的氨基酸序列或来自发表的蛋白质序列的估算值。

[0034] 不可商购获得的寡核苷酸可以化学合成,例如,根据由Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862 (1981) 首次描述的固相亚磷酰胺三酯方法,使用如Van Devanter et.al., *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168 (1984) 中所描述的自动化合成仪。寡核苷酸的纯化使用任何本领域认可的策略进行,例如如Pearson and Reanier, *J. Chrom.* 255:137-149 (1983) 中所述的非变性丙烯酰胺凝胶电泳或阴离子交换高效液相色谱(HPLC)。

[0035] III. 定义

[0036] 如本文中所述的,以下术语具有其归属的含义,除非另有说明。

[0037] 如本文中所述的术语“一个”、“一种”或“所述”不仅包括具有一个/种成员的方面,还包括具有多于一个/种成员的方面。例如,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文明确指示相反。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞,且提及“所述试剂”包括提及一种或多种本领域技术人员已知的试剂,等等。

[0038] 术语“前列腺素E₂”或“PGE₂”是指可以通过花生四烯酸经环氧合酶(COX)和最终的前列腺素E合成酶(PGE5)合成的前列腺素。PGE₂在包括血管舒张、炎症和调节睡/醒循环在内的多种生物功能中起作用。

[0039] 术语“前列腺素E₂受体激动剂”或“PGE₂受体激动剂”是指能够结合并激活任何PGE₂受体,从而刺激PGE₂信号传导通路的化合物、小分子、多肽、生物产品等。

[0040] 术语“减弱PGE₂分解代谢的化合物”是指能够减少或降低PGE₂分解的化合物、小分子、多肽、生物产品等。

[0041] 术语“中和PGE₂抑制的化合物”是指能够阻断或阻碍PGE₂合成、活性、分泌、功能等的抑制剂的化合物、小分子、多肽、生物产品等。

[0042] 术语“衍生物”在化合物的上下文中,包括但不限于给定化合物的酰胺、醚、酯、氨基、羧基、乙酰基和/或醇衍生物。

[0043] 术语“胚胎干细胞来源的肌细胞”或“ESC来源的肌细胞”是指来源于胚胎干细胞或由胚胎干细胞分化的肌细胞。

[0044] 术语“诱导的多能干细胞来源的肌细胞”或“iPSC来源的肌细胞”是指来源于诱导的多能干细胞或由诱导的多能干细胞分化的肌细胞。

[0045] 术语“分离的”在细胞的上下文中,是指至少部分从来源组织(例如,肌肉组织)中与其天然共存的其他细胞类型或其他细胞物质分离和/或纯化的目标单细胞或目标细胞群。当其至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少

约98%，且在某些情况下，至少约99%不含非肌细胞的细胞时，肌细胞群为“分离的”。可以通过任何合适的方法，例如，通过荧光激活的细胞分选来测量纯度。

[0046] 术语“自体的”是指来源于其随后被重新引入个体的同一个体的任何物质（例如，细胞）。

[0047] 术语“同种异体的”是指来源于与引入物质的个体相同物种的不同动物的任何物质（例如，细胞）。当一个或多个位点的基因不不同时，认为两个或更多个体是彼此同种异体的。在一些方面，来自相同物种的个体的同种异体的物质可能是在遗传上足够不同而不能在抗原上相互作用。

[0048] 术语“治疗”或“处理”是指以下中的任意一项：改善一种或多种疾病症状；在其出现前阻止此类症状的显现；减慢或完全阻止疾病进展（其可以通过复发期之间较长的时间段、减慢或阻止症状恶化等显示）；增强缓解期的开始；减慢疾病的进行性-慢性期造成的不可逆损伤（第一阶段和第二阶段）；延迟所述进行性阶段的开始；或以上的任意组合。

[0049] 术语“给予/给药/施用”是指可用于使递送诸如本文中描述的化合物和细胞的试剂或组合物至预期生物作用位点成为可能的方法。这些方法包括但不限于，肠胃外给药（例如，静脉内、皮下、腹膜内、肌内、动脉内、血管内、心内、鞘内、鼻内、皮内、玻璃体内等）、穿粘膜注射、经口给药、以栓剂给药，以及局部给药。本领域技术人员知道用于给予治疗有效量的本文中描述的化合物和/或细胞来预防或减轻一种或多种与疾病或病症相关的症状的其他方法。

[0050] 术语“治疗有效量”或“治疗有效剂量”或“有效量”是指足以产生有益或所需临床效应的化合物、治疗剂（例如，细胞）和/或药物的量。治疗有效量或剂量可以基于每名患者独特的因素，包括但不限于患者年龄、体型、疾病类型或程度、疾病阶段、再生细胞的给药途径、所使用的补充疗法的类型或范围、进行中的疾病过程、以及所需的治疗类型（例如，侵入性的相比常规的治疗）。可由细胞培养和动物模型初步估计本文所述的药物化合物或组合物的治疗有效量。例如，细胞培养方法中测定的 IC_{50} 值可用作动物模型的起始点，而动物模型中测定的 IC_{50} 值可用于探寻人体中的治疗有效剂量。

[0051] 术语“药学可接受的载体”是指不对生物体造成明显刺激且不消除所给予化合物的生物活性和特性的载体或稀释剂。

[0052] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用，是指脊椎动物，优选哺乳动物，更优选人。哺乳动物包括但不限于小鼠、大鼠、类人猿、人、家畜、运动动物和宠物。

[0053] 术语“急性暴露”在化合物给药的上下文中，是指将化合物暂时或短暂施用于受试者，例如，人类受试者或细胞。在一些实施方案中，急性暴露包括在处理过程中或在延长的时间段内化合物的单次施用。

[0054] 术语“间歇暴露”在化合物给药的上下文中，是指将化合物重复施用于受试者，例如，人类受试者或细胞，其中施用之间间隔所需的时间段。

[0055] 术语“急性方案”在化合物给药的上下文中，是指将化合物暂时或短暂施用于受试者，例如人类受试者，或者是指将化合物重复施用于受试者，例如人类受试者，其中施用之间间隔所需的时间段（例如，1天）。在一些实施方案中，急性方案包括在治疗过程中或在延长的时间段内将化合物急性暴露（例如，单次剂量）于受试者。在其他实施方案中，急性方案包括将化合物间歇暴露（例如，重复的剂量）于受试者，其中每次暴露之间间隔所需的时间

段。

[0056] 术语“连续暴露”在化合物给药的上下文中,是指将化合物在延长的时间段内重复地、长期地施用于受试者,例如,人类受试者或细胞。

[0057] 术语“慢性方案”在化合物给药的上下文中,是指将化合物在延长的时间段内重复地、长期地施用于受试者,例如人类受试者,使得化合物的量或水平在选定的时间段内基本稳定。在一些实施方案中,慢性方案包括将受试者在延长的时间段内连续暴露于化合物。

[0058] IV. 实施方案的详细描述

[0059] 在一方面,本文提供了通过用化合物培养分离的肌细胞群而用于刺激分离的肌细胞群增殖、扩增和/或移植的方法,所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及以上的组合。在一些实施方案中,所分离的肌细胞群为基本上纯化的或纯化的(例如,与非肌细胞或非目标的其他细胞分离)。在一些情况下,所分离的肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。在特定的实施方案中,所分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0060] 所分离的肌细胞群可以获自受试者。在其他实施方案中,所分离的肌细胞来自细胞系,例如原代细胞系。在一些情况下,所述受试者患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病。所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病可以选自:急性肌肉损伤、撕伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良 (DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、远端型肌营养不良 (DO)、遗传性肌病、强直性肌营养不良 (MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病 (MM)、重症肌无力 (MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁、以及肌少症。

[0061] 在一些实施方案中,所述PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。在其他实施方案中,所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括这样的化合物、中和肽或中和抗体,其失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶 (15-PGDH),或者失活或阻断前列腺素转运蛋白 (PTG或SLC02A1,其转运细胞内的PGE2以被15-PGDH分解代谢)。

[0062] 在一些实施方案中,用所述化合物培养所述分离的肌细胞群的步骤包括将所述分离的肌细胞群急性地、间歇地或连续地暴露于所述化合物。可以以急性方式将所述分离的细胞暴露于所述化合物一次。在其他情况下,可以在多于一个时间点将所述分离的细胞暴露于所述化合物,这样在暴露之间间隔时间段。在其他情况下,可以将所述分离的细胞连续暴露于所述化合物,这样与所述细胞直接接触的化合物水平不低于预选的量。

[0063] 在特定的实施方案中,本文提供了用于促进受试者肌细胞移植的方法。所述方法包括用有效量的化合物培养或接触分离的肌细胞群来促进所述受试者中所述肌细胞的移植,以及将所述培养或接触的肌细胞给予所述受试者,其中所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0064] 在另一方面,本文提供了包含分离的肌细胞群和化合物的组合物,其中所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和

PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物、以及以上的组合。在一些实施方案中,所述分离的肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。在一些情况下,所述分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。所述组合物还可包含药学可接受的载体。

[0065] 在又一方面,本文提供了试剂盒,其包含本文公开的任一种组合物以及说明书。

[0066] 在另一方面,本文提供了在患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的受试者中再生肌细胞群的方法。所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的化合物和药学可接受的载体来增加所述受试者的肌细胞群和/或增强所述受试者的肌肉功能,其中所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0067] 在相关方面,本文提供了在患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的受试者中刺激肌细胞群增殖和/或扩增的方法。所述方法包括给予所述受试者治疗有效量的化合物和药学可接受的载体来增加所述受试者的肌细胞群和/或增强所述受试者的肌肉功能,其中所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0068] 在一些实施方案中,所述肌细胞群包括内源性肌细胞群。在其他实施方案中,所述肌细胞群包括已给予(例如,注射或移植)所述受试者的分离的肌细胞群。在其他实施方案中,所述肌细胞群包括已给予所述受试者的内源性肌细胞群和分离的肌细胞群。

[0069] 在一些实施方案中,所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病选自:急性肌肉损伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良 (DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、远端型肌营养不良 (DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良 (MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病 (MM)、重症肌无力 (MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁、以及肌少症。

[0070] 在一些实施方案中,所述肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。在一些情况下,所述肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0071] 在一些实施方案中,所述PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。

[0072] 在一些实施方案中,所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶 (15-PGDH) 或者失活或阻断前列腺素转运蛋白 (PTG或SLCO2A1) 的化合物、中和肽或中和抗体。

[0073] 在一些实施方案中,给予所述化合物的步骤包括经口、腹膜内、肌肉内、动脉内、皮下、静脉内,或心内给药。在一些情况下,所述化合物根据急性方案给药。在某些情况下,所述急性方案包括将所述受试者急性地暴露(例如,单次剂量)于所述化合物。在其他情况下,所述急性方案包括将所述受试者间歇地暴露(例如,重复的剂量)于所述化合物。作为一个非限制性的实例,急性PGE2方案可以包括在所需时间段内(例如,在2、3、4、5、6或7天的过程中)PGE2的一系列间歇(例如,每天)剂量。

[0074] 在其他实施方案中,所述给予步骤还包括将分离的肌细胞群给予所述受试者。所述分离的肌细胞群可以为所述受试者自体的。所述分离的肌细胞群可以为所述受试者同种异体的。在一些情况下,所述分离的肌细胞群为基本上纯化的或纯化的。在其他情况下,在给予所述受试者之前用所述化合物培养所述分离的肌细胞群。用所述化合物培养所述分离的肌细胞群的步骤可以包括将所述分离的肌细胞群急性地、间歇地或连续地暴露于所述化合物。给予所述分离的肌细胞群可以包括将所述细胞注射或移植至所述受试者。所述分离的肌细胞群和所述化合物可以同时给予所述受试者。可选地,所述分离的肌细胞群和所述化合物可以依次给予所述受试者。

[0075] 在另一方面,本文提供了预防或治疗有需要的受试者中与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的方法。所述方法包括给予所述受试者以下物质来预防或治疗与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病:(i) 治疗有效量的化合物和药学可接受的载体,所述化合物选自:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合,以及(ii) 分离的肌细胞群。

[0076] 在相关方面,本文提供了通过给予所述受试者以下物质来在患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的受试者中刺激肌细胞群增殖和/或扩增的方法:(i) 选自以下的治疗有效量的化合物和药学可接受的载体:前列腺素E2 (PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合,以及(ii) 分离的肌细胞群。在一些实施方案中,所述肌细胞群包括内源性肌细胞群。在其他实施方案中,所述肌细胞群包括已给予(例如,注射或移植)所述受试者的分离的肌细胞群。在其他实施方案中,所述肌细胞群包括内源性肌细胞群和已给予所述受试者的分离的肌细胞群。在某些实施方案中,所述治疗有效量的化合物包括这样的量,其足以增加所述受试者的内源性肌细胞群和/或增加已给予所述受试者的分离的肌细胞群和/或增强所述受试者的肌肉功能。

[0077] 在一些实施方案中,所述PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。在一些情况下,所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PTG或SLCO2A1)的化合物、中和肽或中和抗体。

[0078] 在一些实施方案中,所述肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。在一些情况下,所述肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。所述分离的肌细胞群可以为基本纯化的或纯化的。

[0079] 在一些实施方案中,所述分离的肌细胞群在给予所述受试者之前用所述化合物培养。在一些情况下,用所述化合物培养所述分离的肌细胞群包括将所述肌细胞群急性地、间歇地或连续地暴露于所述分离的所述化合物。

[0080] 在一些实施方案中,所述分离的肌细胞群为所述受试者自体的。在其他实施方案中,所述分离的肌细胞群为所述受试者同种异体的。

[0081] 所述化合物的给予可以为经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心内给药。在一些情况下,根据急性方案给予所述化合物。在某些情况下,所述急性方案包括将所述化合物急性地暴露(例如,单次剂量)于所述受试者。在其他情况下,所述急性方案包括

将所述化合物间歇地暴露于(例如,重复的剂量)所述受试者。作为一个非限制性实例,急性PGE2方案可以包括在所需的时间段内(例如,在2、3、4、5、6或7天的过程中)PGE2的一系列间歇(例如,每天)剂量。给予所述分离的肌细胞群可以包括将所述细胞注射或移植至所述受试者。所述化合物和所述分离的肌细胞群可以同时给予所述受试者。任选地,所述化合物和所述分离的肌细胞群可以依次给予所述受试者。

[0082] 在一些实施方案中,所述受试者疑似患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病,或者处于与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的风险。在一些情况下,所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病选自:急性肌肉损伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、远端型肌营养不良(DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良(MOD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁、以及肌少症。

[0083] A. 刺激肌细胞增殖或移植的方法

[0084] 本文提供了用于刺激或促进分离的肌细胞增殖和/或移植的体外或离体方法。所述方法包括用以下物质培养或接触分离的肌细胞群:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,或以上的组合。可以将所述化合物加入用于维持或增殖所述细胞的任何培养基。

[0085] 所述化合物可以为能够模拟、激活或刺激PGE2信号转导的任何小分子、前药、生物产品等。在一些情况下,所述化合物为PGE2(即地诺前列酮)、合成的PGE2衍生物(例如,16,16-二甲基前列腺素E2;dmPGE2)、合成的PGE2类似物、合成的PGE2变体,或肌肉特异性的PGE2变体。在其他情况下,所述化合物为PGE2前药,如在暴露至肌肉细胞或与肌细胞极为接近时能够分解代谢为具药理学活性的PGE2药物的PGE2前药。在其他情况下,所述化合物可以为包括PGE2受体1、PGE2受体2、PGE2受体3和PGE2受体4在内的PGE2受体中的任一种的激动剂。所述激动剂可以特异性结合或激活一种或多种PGE2受体。在一些情况下,所述化合物可以为减弱、阻碍、抑制或降低PGE2分解代谢的化合物,如失活或阻断能够降解或分解代谢PGE2的酶(如15-羟基-前列腺素脱氢酶(15-PGDH))的化合物或中和(阻断)抗体。在其他情况下,所述化合物阻断、阻止或对抗PGE2和/或PGE2合成、活性和/或分泌的抑制。

[0086] 在一些实施方案中,本文描述的化合物可以引发肌细胞的增殖,包括静止期肌细胞。所述分离的肌细胞群可以为纯的或基本上纯的肌细胞群,这样所述肌细胞的至少约90%为单一类型的肌细胞。在其他实施方案中,所述群为肌细胞的混合物,其中不到约90%的细胞为同一细胞类型。在一些情况下,所述肌细胞包括从受试者收获的骨骼肌细胞、平滑肌细胞和/或心肌细胞。在其他情况下,所述肌细胞由胚胎干细胞产生或分化,例如,人胚胎干细胞或诱导的多能干细胞,例如,人的诱导的多能干细胞。在其他方面,所述肌细胞为去分化的肌细胞。在一些实施方案中,所述分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。例如,所述分离的肌细胞可以为纯的或基本上纯的肌肉干细胞群。可选地,所述分离的肌细胞可以为纯的或基本上纯的卫星细胞群。在其他情况下,所述分离的肌细胞可以为肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维或以上的任意组合的异源混合物。这样,所述混合物可以包含肌肉干细胞和卫星细胞,以及任选地,肌细胞。

[0087] 在一些实施方案中,所述肌细胞或所述诱导的多能干细胞来源于患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的受试者。在一些实施方案中,所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病为急性肌肉损伤、撕伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、远端型肌营养不良(DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁、肌少症,或以上的任意组合。

[0088] 在特定的实施方案中,提供了在受试者中促进肌细胞移植的离体方法。所述方法包括用有效量的化合物培养或接触分离的肌细胞群来促进受试者肌细胞的移植,其中所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。所述方法还包括将所培养或接触的肌细胞给予所述受试者。在一些情况下,所述分离的肌细胞群为所述受试者自体的。在其他情况下,所述分离的肌细胞群为所述受试者同种异体的。在一些实施方案中,所述受试者为人。在一些实施方案中,所述受试者患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病。在一些实施方案中,所述方法还包括给予所述受试者治疗有效量的化合物和药学可接受的载体,其中所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。可以在将所培养或接触的肌细胞给予所述受试者之前、同时和/或之后,将所述化合物给予所述受试者。在一些情况下,所述分离的肌细胞群用与给予所述受试者相同的化合物培养或接触。在其他情况下,所述分离的肌细胞群用与给予所述受试者不同的化合物培养或接触。

[0089] 所述肌细胞可以获自身体的任何肌肉,包括但不限于胸肌复合肌、背阔肌、大圆肌和肩胛下肌、肱桡肌、二头肌、肱肌、旋前方肌、旋前圆肌、桡侧腕屈肌、尺侧腕屈肌、指浅屈肌、指深屈肌、拇短屈肌、拇对掌肌、拇收肌、拇短屈肌、髂腰肌、腰大肌、腹直肌、股直肌、臀大肌、臀中肌、内侧腓绳肌、腓肠肌、外侧腓绳肌、股四头肌、长收肌、短收肌、大收肌、内侧腓肠肌、外侧腓肠肌、比目鱼肌、胫骨后肌、胫骨前肌、趾长屈肌、趾短屈肌、拇长屈肌、拇长伸肌、手部肌肉、手臂肌肉、足部肌肉、腿部肌肉、胸部肌肉、腹部肌肉、背部肌肉、臀部肌肉、肩部肌肉、头部和颈部肌肉等。

[0090] 在一些实施方案中,从特定肌肉获取所述肌细胞,根据本文公开的方法进行扩增,然后移植回相同的肌肉,或者可选地,移植至不同的肌肉。在一些情况下,所述肌细胞的来源和所述移植部位为受试者的同一肌肉。在其他情况下,所述肌细胞的来源和所述移植部位为受试者的不同肌肉。在其他情况下,所述肌细胞的来源和所述移植部位为来自不同受试者的相同类型的肌肉。在其他情况下,所述肌细胞的来源和所述移植部位为来自不同受试者的不同类型的肌肉。

[0091] 可以用本文公开的化合物急性地、间歇地或连续地培养分离的肌细胞。在一些实施方案中,将所述细胞暴露于单剂量的所述化合物一段时间。在其他实施方案中,将所述细胞暴露于至少两倍或更多倍剂量的所述化合物,这样给药之间间隔一段时间,例如一天、两天、一周或更久。在一些实施方案中,将所述细胞长期或连续暴露于所述化合物,例如,在一段持续时间内不改变化合物浓度或不改变对细胞的影响。

[0092] B. 在受试者中再生受损伤肌细胞的方法

[0093] 本文提供的方法可用于受试者(如人受试者)的肌肉再生或复原。肌肉再生包括从肌肉干细胞、卫星细胞、肌肉祖细胞,和以上的任意组合形成新的肌肉纤维。所述方法还可用于增强或增加肌肉修复和/或维持。

[0094] 可以将本发明的PGE2化合物给予经历肌肉退化或萎缩的受试者。肌肉萎缩可以包括肌肉质量和/或力量的损失,其可以影响受试者的任何肌肉。在一些情况下,需要本文提供的组合物、方法和试剂盒的受试者由于例如年龄、不活动、损伤、患病和以上的任意组合而显示或经历肌肉损失。

[0095] 在一些实施方案中,化合物可以激活肌细胞增殖、分化和/或肌细胞的融合。在一些情况下,使所述肌肉组织再生。在其他情况下,使肌肉功能(例如肌肉质量、肌肉力量和/或肌肉收缩)修复或增强。在一些情况下,肌肉无力和萎缩得到改善。

[0096] 所述受损伤的肌肉可以为身体的任何肌肉,包括但不限于胸肌、背阔肌、大圆肌和肩胛下肌、肱桡肌、二头肌、肱肌、旋前方肌、旋前圆肌、桡侧腕屈肌、尺侧腕屈肌、指浅屈肌、指深屈肌、拇短屈肌、拇对掌肌、拇收肌、拇短屈肌、髂腰肌、腰肌、腹直肌、股直肌、臀大肌、臀中肌、内侧腓绳肌、腓肠肌、外侧腓绳肌、股四头肌、长收肌、短收肌、大收肌、内侧腓肠肌、外侧腓肠肌、比目鱼肌、胫骨后肌、胫骨前肌、趾长屈肌、趾短屈肌、拇长屈肌、拇长伸肌、手部肌肉、手臂肌肉、足部肌肉、腿部肌肉、胸部肌肉、腹部肌肉、背部肌肉、臀部肌肉、肩部肌肉、头部和颈部肌肉、面部肌肉、眼咽肌肉等。

[0097] 需要肌肉再生的受试者可能具有肌肉骨骼损伤(例如骨折、拉伤、扭伤、急性损伤、使用过度损伤等)、创伤后四肢或面部损伤、运动损伤、老年人骨折、手部软组织损伤、肌肉萎缩(例如,肌肉量减少)、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、福山型先天性肌营养不良(FCMD)、肢带型肌营养不良(LGMD)、先天性肌营养不良、面肩肱型肌营养不良(FHMD)、强直性肌营养不良、眼咽型肌营养不良、远端型肌营养不良、埃德型(Emery-Dreifuss)肌营养不良、先天性肌强直、肌紧张性营养不良、其他肌营养不良、肌肉萎缩症,如由于癌症、终末期肾病(ESRD)、获得性免疫缺陷综合症(AIDS)或慢性阻塞性肺病(COPD)造成的恶病质、术后肌无力、创伤后肌无力、肌少症、不活动(例如,肌肉停用或不动)、尿道括约肌缺陷、尿道括约肌缺陷、神经肌肉疾病等。

[0098] 神经肌肉疾病的非限制性实例包括但不限于酸性麦芽糖酶缺乏症、肌萎缩侧索硬化、Andersen-Tawil综合征、Becker型肌营养不良、Becker型先天性肌强直、Bethlem肌病、延髓性肌肉萎缩、肉碱缺乏症、肉碱棕榈酰基转移酶缺乏症、中央轴空病、中央核肌病、Charcot-Marie-Tooth病、先天性肌营养不良、先天性肌无力综合征、先天性肌强直性营养不良、Cori病、脱支酶缺乏、Dejerine-Sottas病、皮炎、远端型肌营养不良、Duchenne型肌营养不良、营养不良性肌强直、埃德型肌营养不良、内分泌性肌病、Eulenberg病、面肩肱型肌营养不良、胫骨远端肌病、弗里德希氏(Friedreich)共济失调、福山型(Fukuyuma)先天性肌营养不良、10型糖原贮积症、11型糖原贮积症、2型糖原贮积症、3型糖原贮积症、5型糖原贮积症、7型糖原贮积症、9型糖原贮积症、Gowers-Laing远端型肌病、遗传性包涵体肌炎、甲亢性肌病、甲减性肌病、包涵体肌炎、遗传性肌病、整合素缺陷性先天性肌营养不良、脊髓性肌萎缩、脊髓性肌萎缩、乳酸脱氢酶缺乏症、Lambert-Eaton肌无力综合征、McArdel病、merosin缺陷性先天性肌营养不良、肌肉代谢性疾病、线粒体性肌病、Miyoshi远端型肌病、

运动神经元疾病、肌-眼-脑病、重症肌无力、肌腺苷酸脱氨酶缺乏症、肌纤维性肌病、肌磷酸化酶缺乏症、先天性肌强直、强直性肌营养不良、肌管性肌病、线状体肌病、Nonaka远端型肌病、眼咽型肌营养不良、先天性副肌强直、Pearson综合征、周期性麻痹、磷酸果糖激酶缺乏症、磷酸甘油酸激酶缺乏症、磷酸甘油酸变位酶缺乏症、磷酸酶缺乏症、多肌炎、庞培氏(Pompe)病、进行性眼外肌瘫痪、脊髓性肌肉萎缩、Ullrich先天性肌营养不良、Welander远端型肌病、ZASP相关肌病等。

[0099] 肌肉萎缩(例如,肌肉消耗)可能由以下原因造成或与以下原因相关,例如,正常衰老(例如,肌少症)、遗传异常(例如,突变或单核苷酸多态性)、营养不良、循环不良、丧失荷尔蒙支持、由于缺少锻炼(例如,卧床、肢体石膏固定等)造成的肌肉停用、衰老、损伤激活肌肉的神经、脊髓灰质炎、肌萎缩侧索硬化(ALS或路格里克氏病)、心力衰竭、肝病、糖尿病、肥胖、代谢综合征、脱髓鞘疾病(例如,多发性硬化、Charcot-Marie-Tooth病、Pelizaeus-Merzbacher病、脑脊髓炎、视神经脊髓炎、肾上腺脑白质营养不良和格林-巴利综合征)、去神经、疲劳、锻炼诱导的肌肉疲劳、虚弱、神经肌肉疾病、无力、慢性痛等。

[0100] 在一些方面,本文提供了在有需要的受试者中再生肌肉的方法,其通过给予所述受试者治疗有效量的化合物和药学可接受的载体在所述受试者中增加肌细胞群和/或增强肌肉功能,其中所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。所述受试者中的肌细胞群可以包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的任意组合。另外,所述受试者中的肌细胞可以为肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的任意组合。可以通过以下途径将所述化合物给予所述受试者:经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心内给药。在一些情况下,将所述化合物直接给予所述功能异常的、损伤的、创伤的和/或萎缩的肌肉。可以根据急性方案(例如,单次或间歇给药)或长期方案(例如,连续给药)给予所述化合物。

[0101] 在一些实施方案中,所述受试者还被给予所述受试者自体的或同种异体的分离(或分离并纯化)的肌细胞群。可以通过本领域技术人员已知的任何方法分离和/或纯化所述细胞。所述细胞可以为同源的或异源的肌细胞群。

[0102] 在一些实施方案中,在将细胞给予所述受试者之前通过用所述PGE2化合物培养所述细胞来刺激所述细胞增殖。可以在体外培养期间将所述化合物急性地、间歇地或连续地暴露于所述细胞。在一些情况下,在用所述PGE2化合物培养后,所述肌细胞群增加了至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约200%、至少约500%、至少约1000%,或更多。

[0103] 为了再生或修复所述受试者的肌肉,将本发明的化合物和所述分离的肌细胞同时给予所述受试者。在一些实施方案中,将所述化合物和所述培养的肌细胞同时给予所述受试者。在其他实施方案中,将所述化合物和所述分离的肌细胞依次给予所述受试者。在其他实施方案中,将所述化合物和所述培养的肌细胞依次给予所述受试者。

[0104] 本文中描述的方法可以用于将肌肉纤维的数目增加至少约1%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少

约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约200%、至少约500%、至少约1000%或更多。在一些实施方案中,所述方法可以增加创伤的、损伤的、萎缩的或退化的肌肉的生长。

[0105] C. 影响肌肉的病症或疾病的预防或治疗方法

[0106] 本文中提供的方法可用于在有需要的受试者中预防或治疗与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病。所述方法可以为可能会经历肌肉创伤、损伤或萎缩的受试者提供预防性治疗。在一些实施方案中,所述受试者可能患有具有可能影响肌肉的第二症状的病症或疾病。在其他实施方案中,所述受试者已接受手术或治疗干预来治疗所述肌肉病症或疾病,并且将本文公开的方法用于预防或抑制再现或复发。在一些实施方案中,所述受试者患有本文描述的任一种影响肌肉的病症或疾病。

[0107] 如本文中所述的,术语“处理/治疗”包括在疾病症状发作之前和/或在所述病症或疾病的临床表现或其他显现之后给予合适形式的化合物和/或细胞,来减轻疾病严重性、停止疾病进展或消除疾病。术语“预防/防止”疾病包括延长或延迟所述病症或疾病的症状发作,优选在对所述病症或疾病具有增加的敏感性的受试者中。

[0108] 所述方法包括给予所述受试者以下物质来预防或治疗所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病:(i) 治疗有效量的化合物和药学可接受的载体,其中所述化合物选自:前列腺素E₂(PGE₂)、PGE₂前药、PGE₂受体激动剂、减弱PGE₂分解代谢的化合物、中和PGE₂抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合,以及(ii) 分离的肌细胞群。所述肌细胞可以为所述受试者自体的或同种异体的。

[0109] 所述化合物可以通过以下途径给药:经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或通过心内注射。可以根据急性方案(例如,单次或间歇给药)或慢性方案(例如,连续给药)给予所述化合物。可以通过注射或移植给予所述分离的肌细胞。在一些实施方案中,所述化合物和所述细胞被一起或同时给药。在其他实施方案中,所述化合物和所述细胞被依次给药。在一些情况下,所述化合物在所述细胞之前给药。在其他情况下,所述细胞在所述化合物之前给药。

[0110] 在注射或移植至所述受试者之前,所述分离的肌细胞可以为基本上纯化的或纯化的。也可在施用之前,在培养中扩增或刺激所述细胞以增殖。如本文所描述的,可以用本发明的化合物培养分离的肌细胞,包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞、肌肉干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌细胞、肌管、肌纤维,和以上的任意组合。通过将所述化合物急性地、间歇地或连续地暴露于所述细胞,所述肌细胞增殖且数目增加。可以将扩增的细胞移植至经历肌肉创伤、损伤或萎缩的受试者。

[0111] D. 前列腺素E₂(PGE₂)化合物

[0112] 在一些实施方案中,本发明的化合物选自:PGE₂、PGE₂前药、PGE₂受体激动剂、减弱PGE₂分解代谢的化合物、中和PGE₂抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。在一些情况下,减弱PGE₂分解代谢的化合物可以为化合物、中和肽或中和抗体,其失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(其转运细胞内的PGE₂被15-PGDH分解代谢)。所述前列腺素转运蛋白也称为2310021C19Rik、MATR1、Matrin F/Q、OATP2A1、PGT、PHOAR2、SLC21A2、可溶性载体有机阴离子转运蛋白家族成员2A1

和SLC02A1。

[0113] 所述PGE2受体激动剂可以为小分子化合物,其为特异性结合PGE2受体等的激活性抗体。在一些实施方案中,所述化合物为PGE2衍生物或类似物。在一些实施方案中,所述化合物为PGE2前药。例如,在给药或肌肉再生的部位,或在将所述前药暴露至肌细胞时,PGE2前药可以分解代谢为具药学活性的PGE2药物。

[0114] 在特定的实施方案中,所述化合物为PGE2衍生物或类似物,其包含对PGE2的一个或多个修饰,所述修饰增加其稳定性、活性、耐降解能力、转运至肌细胞(例如,促进细胞摄取),和/或停留在肌细胞中(例如,摄取后减少从肌细胞的分泌)。

[0115] 非限制性地,PGE2衍生物和类似物的实例包括2,2-二氟-16-苯氧基-PGE2化合物、2-去羧基-2-羟甲基-16-氟-PGE2化合物、2-去羧基-2-羟甲基-11-二氧-PGE2化合物、19(R)-羟基PGE2、16,16-二甲基PGE2、16,16-二甲基PGE2对(对乙酰氨基苯甲酰氨基)苯酯、11-脱氧-16,16-二甲基PGE2、9-脱氧-9-亚甲基-16,16-二甲基PGE2、9-脱氧-9-亚甲基PGE2、布他前列素(butaprost)、硫前列酮、恩前列素(enprostil)、PGE2丝氨酸酰胺、PGE2甲酯、16-苯基四去甲(tetranor)PGE2、5-反式PGE2、15(S)-15-甲基PGE2,和15(R)-15-甲基PGE2。其他PGE2衍生物和类似物例如,在第5,409,911号美国专利中列出。

[0116] PGE2衍生物和类似物的其他非限制性实例包括Zhao et al. (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17:6572-5 (2007))中描述的更稳定的PGE2类似物——PGE2的乙内酰胺衍生物,其中羟基环戊酮环被杂环取代,且未饱和的 α -烯基链被苯乙基链取代;Ungrin et al. (Mol. Pharmacol., 59:1446-56 (2001))中描述的PGE2类似物;Tanami et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett., 8:1507-10 (1998))中描述的PGE2的13-脱氢衍生物;以及第8,546,603号和第8,158,676号美国专利中描述的取代的环戊烷。

[0117] 在一些实施方案中,所述化合物为PGE2受体,例如,EP1受体、EP2受体、EP3受体和EP4受体的激动剂。PGE2受体激动剂的非限制性实例包括ONO-D1-004、ONO-AE1-259、ONO-AE-248、ONO-AE1-329、ONO-4819CD (Ono Pharmaceutical Co., Japan)、L-902688 (Cayman Chemical)、CAY10598 (Cayman Chemical),和CP-533536 (Pfizer)。其他的PGE2受体激动剂例如,在第6,410,591号;第6,610,719号;第6,747,037号;第7,696,235号;第7,662,839号;第7,652,063号;第7622,475号;和第7,608,637号美国专利中有描述。

[0118] E. 分离的肌细胞

[0119] 本发明的肌细胞(肌源性细胞)包括但不限于肌肉干细胞、骨骼肌干细胞、平滑肌干细胞、心肌干细胞、肌肉卫星细胞、肌源性的祖细胞、肌源性的细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、有丝分裂后的肌管、多核的肌纤维和有丝分裂后的肌肉纤维。在一些实施方案中,所述分离的肌细胞包括肌肉干细胞。在其他实施方案中,所述分离的肌细胞包括肌肉卫星细胞。所述肌细胞可以来源于干细胞,如骨髓来源的干细胞,或者多能干细胞,如胚胎干细胞或诱导的多能干细胞。在一些实施方案中,所述分离的肌细胞包括去分化的肌细胞。在其他实施方案中,所述肌细胞经遗传改造,以在一些情况下纠正疾病相关的基因突变。

[0120] 卫星细胞是可以定植于肌肉组织内的小单核祖细胞。这些细胞可被诱导增殖和分化为肌细胞,且在一些情况下融合至肌纤维。在肌肉创伤或损伤期间,静止期卫星细胞(例如,当时未分化或经历细胞分裂的卫星细胞)和肌肉干细胞可以被激活而增殖,和/或迁出肌肉干细胞微环境(niche)。所述卫星细胞和肌肉干细胞也可分化为肌细胞、成肌细胞或其

他肌细胞类型。

[0121] 从胚胎干细胞生成肌细胞的方法和方案例如,在Hwang et al., PLoS One, 2013, 8 (8):e72023;和Darabi et al., Cell Stem Cell, 2012, 10(5):610-9中有描述。从诱导的多能干细胞生成肌细胞的方法和方案例如,在Darabi et al., Cell Stem Cell, 2012, 10(5):610-9;Tan et al., PLoS One, 2011;和Mizuno et al., FASEB J., 2010, 24(7):2245-2253中有描述。

[0122] 在一些实施方案中,通过活检肌肉获得肌细胞,所述肌肉如来自个体的成熟或成体肌肉,例如,四头肌、臀大肌、二头肌、三头肌或任何肌肉。所述肌肉可以为骨骼肌、平滑肌或心肌。分离平滑肌干细胞的方法的详细描述可以例如,在第8,747,838号美国专利和第20070224167号美国专利申请公开中找到。从肌肉组织分离目标肌细胞如肌肉干细胞或卫星细胞的方法例如,在Blanco-Bose et al., Exp. Cell Res., 2001, 26592:212-220中有详细描述。

[0123] 纯化目标肌细胞群如肌肉干细胞、肌肉卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管和/或肌纤维的方法,包括选择、分离或富集具有表达于目标肌细胞的细胞表面的特异性细胞表面标志物或特异性多肽的细胞。可用的细胞表面标志物描述于例如, Fukada et al., Front. Physiol, 2013, 4:317。可以实施细胞分选方法将目标肌细胞与其他细胞类型隔离或分离,如流式细胞术,例如,荧光活化的细胞分选(FACS);磁珠细胞分离,例如,磁活化的细胞分选(MACS),和其他基于抗体的细胞分选方法。

[0124] 所述分离的目标肌细胞群可以使用基于培养的常规方法扩增或繁殖。培养肌细胞的方法可以在例如,第5,324,656号美国专利中找到。在一些情况下,在支架或诸如水凝胶的凝胶上培养所述细胞。

[0125] F. 施用方法

[0126] 可以在受试者的损伤部位或其附近局部施用本发明的化合物,或全身施用本发明的化合物。在一些实施方案中,可以通过以下方式施用所述化合物,例如,腹膜内、肌内、动脉内、经口、静脉内、颅内、鞘内、脊柱内、病变内、鼻内、皮下、脑室内、局部和/或通过吸入。可以与目标肌细胞同时或依序施用所述化合物。当所述化合物与所述细胞同时施用时,所述化合物和细胞可以在同一组合物中施用。当分开施用时,所述化合物可以在药学可接受的载体中提供。在一些实施方案中,在给予所述细胞之前或之后施用所述化合物。

[0127] 在一些实施方案中,所述化合物根据急性方案给药。在某些情况下,所述化合物被一次性给予所述受试者。在其他情况下,所述化合物在一个时间点施用,且在第二个时间点再次施用。在其他情况下,所述化合物以间歇剂量在较短时间段内(例如,2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1个月或更久)重复给予所述受试者(例如,每天一次或两次)。在一些情况下,化合物施用之间的时间为约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、1个月或更久。在其他实施方案中,根据慢性方案,在所需的时间段内连续或长期地给予所述化合物。例如,可以给予所述化合物,使得所述化合物的量或水平在所选的时间段内基本稳定。

[0128] 可以通过本领域通常使用的方法来实现所述分离的肌细胞至受试者的施用。在一些实施方案中,通过移植或注射如肌内注射进行施用。引入的细胞数目需要考虑诸多因素,如性别、年龄、体重、疾病或病症的类型、病症的阶段、所述细胞群中所需细胞的百分比(例

如,细胞群的纯度),以及产生预期结果所需要的细胞数目。通常,出于治疗目的施用细胞时,所述细胞以药学有效剂量给予。“药学有效量”或“药学有效剂量”是指足以产生所需的生理效应的量,或能够实现预期结果的量,特别是对于治疗所述病症或疾病,包括减少或消除所述病症或疾病的一种或多种症状或临床表现。药学有效剂量也适用于本文描述的与所述细胞组合使用的治疗化合物。

[0129] 细胞可以一次注射施用或通过足量以产生治疗效应的指定时间段内连续注射施用。当治疗涉及连续注射时,可以注射不同的肌细胞群。药学可接受的载体,如下文中进一步描述的,可用于将所述细胞注射至所述受试者。这些通常包括,例如,缓冲盐水(例如,磷酸盐缓冲盐水)、或未添加的基础细胞培养基、或本领域已知的培养基。

[0130] 可以用本发明的化合物和/或细胞直接注射任何数量的身体肌肉,如,例如,二头肌;三头肌;肱桡肌;肱肌(臂前肌);浅层隔室(compartment)屈腕肌;三角肌;腓绳肌的股二头肌、股薄肌、半腱肌和半膜肌;四头肌的股直肌、股外侧肌、股内侧肌和股中间肌;小腿的腓肠肌(外侧和中间)、胫骨前肌和比目鱼肌;胸部的胸大肌和胸小肌;上背部的背阔肌;菱形肌(大肌和小肌);横跨颈部、肩部和背部的斜方肌;腹部的腹直肌;以及臀部的臀大肌、臀中肌和臀小肌。

[0131] G. 药物组合物

[0132] 本发明的化合物和细胞的药物组合物可以包含药学可接受的载体。在某些方面,药学可接受的载体部分由所施用的具体组合物以及由施用所述组合物的具体方法确定。相应地,存在多种适合的本发明的药物组合物制剂(参见,例如,雷明登氏药学全书,第18版, Mack Publishing Co., Eastern, PA(1990))。

[0133] 如本文中所述的,“药学可接受的载体”包括本领域普通技术人员在配制药剂组合物中已知的任何标准的药学可接受的载体。因此,细胞或化合物本身作为药学可接受的盐或作为缀合物存在,可以制备成药学上可接受的稀释剂中的制剂;例如,盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇水溶液,或葡萄糖、甘露醇、葡聚糖、丙二醇、油(例如,植物油、动物油、合成油等)、微晶纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸钙、明胶、聚山梨酯80等的溶液,或作为适当赋形剂中的固体制剂。

[0134] 所述药物组合物通常还包含一种或多种缓冲剂(例如,中性缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)、碳水化合物(例如,葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖)、甘露醇、蛋白质、多肽或氨基酸如甘氨酸、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠、丁基化羟基甲苯、丁基化羟基苯甲醚等)、抑菌剂、螯合剂如EDTA或谷胱甘肽、使得制剂与受体血液等渗、低渗或弱高渗的溶质、混悬剂、增稠剂、防腐剂、调味剂、甜味剂和着色化合物,视情况而定。

[0135] 本发明的药物组合物以与剂量剂型相容的方式施用,并且这样的量将是治疗有效的。施用的量取决于多种因素,包括例如,年龄、体重、身体活动和个体饮食、待治疗的病症或疾病,以及所述病症或疾病的阶段或严重性。在某些实施方案中,剂量的大小还可通过伴随在特定个体中施用治疗剂的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定。

[0136] 然而,应当理解,任何特定患者的具体剂量水平和给药频率可能存在差异,并且取决于多种因素,包括所采用具体化合物的活性、代谢稳定性和该化合物的作用时间长度、年龄、体重、遗传特征、总体健康状况、性别、饮食、给药方式和时间、排泄率、药物组合、具体病症的严重程度以及宿主正在接受的治疗。

[0137] 在某些实施方案中,所述化合物的剂量可以采用固体、半固体、冻干粉形式或液体剂量的形式,如,例如,片剂、丸剂、小球、胶囊、粉剂、溶液、混悬剂、乳剂、栓剂、保留灌肠剂、霜剂、软膏剂、洗剂、凝胶剂、气雾剂、泡沫剂等,优选以适于简单施用精确剂量的单位剂型。

[0138] 如本文中所述的,术语“单位剂型”是指适合作为人和其他哺乳动物的单一剂量的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的治疗剂,经计算能够产生所需的起效、耐受性和/或治疗效果,并与合适的药物赋形剂(例如,安瓿)联合使用。另外,可以制备更为浓缩的剂型,然后可以由其制备更多的稀释单位剂型。因此,更为浓缩的剂型包含基本上超过,例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍的治疗化合物的量。

[0139] 制备这种剂型的方法是本领域技术人员已知的(参见,例如,雷明登氏药学全书,同上)。所述剂型通常包含常规药物载体或赋形剂,且可以另外包含其他药剂、载体、佐剂、稀释剂、组织渗透增强剂、增溶剂等。适当的赋形剂可以通过本领域熟知的方法(参见,例如雷明登氏药学全书,同上)适应具体的剂型和给药途径。

[0140] 合适的赋形剂的实例包括但不限于,乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、黄耆胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、盐水、糖浆、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和聚丙烯酸如卡波姆(Carbopols),例如,卡波姆941、卡波姆980、卡波姆981等。剂型可另外包含润滑剂如滑石、硬脂酸镁和矿物油;湿润剂;乳化剂;混悬剂;防腐剂如甲基-羟基-苯甲酸盐、乙基-羟基-苯甲酸盐和丙基-羟基-苯甲酸盐(即,对羟基苯甲酸盐);pH调节剂如无机酸和有机酸及碱;增甜剂;和调味剂。所述剂量形式还可包含可生物降解的聚合物小珠、葡聚糖和环糊精包合物。

[0141] 对于经口给药,所述治疗有效剂量可以为以下形式:片剂、胶囊、乳剂、混悬剂、溶液、糖浆、喷雾剂、锭剂、粉剂和缓释剂。用于经口给药的合适的赋形剂包括药物级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、明胶、蔗糖、碳酸镁等。

[0142] 所述治疗有效剂量还可以冻干形式提供。这样的剂型可包含缓冲剂,例如,碳酸氢盐,用于在给药前复溶,或者缓冲剂可以包含在冻干剂型中,用于与例如水复溶。所述冻干剂型还可包含合适的血管收缩剂,例如肾上腺素。所述冻干剂型可以在注射器内提供,任选地与用于复溶的缓冲剂组合包装,使得所复溶的剂型可以立即施用于个体。

[0143] H. 试剂盒

[0144] 本文中描述的组合物其他实施方案为试剂盒,其包含分离的肌细胞群和选自以下的化合物:前列腺素E₂(PGE₂)、PGE₂前药、PGE₂受体激动剂、减弱PGE₂分解代谢的化合物(例如,15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)抑制剂或前列腺素转运蛋白(PTG或SLC02A1)抑制剂)、中和PGE₂抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。所述试剂盒通常包含容器,其可以由诸如玻璃或塑料的多种材料制成,并且可以包括例如瓶子、小瓶、注射器和试管。所述试剂盒通常带有标签,并且标签包括任何书写或记录的材料,其可以为电子的或计算机可读的形式,提供使用试剂盒内件的说明或其他信息。

[0145] V. 实施例

[0146] 以下所提供的实施例仅用于说明而非限制所要求保护的发明内容。

[0147] 实施例1:急性前列腺素E₂递送增加老龄小鼠的骨骼肌再生和力量

[0148] 本实施例说明了PGE₂信号传导在再生期间是肌肉干细胞功能所必需的。

[0149] 老龄者罹患进行性骨骼肌萎缩和再生失败,这降低了活动性和生活质量^{1,2}。对肌肉再生至关重要是成年肌肉干细胞(MuSC),其在整个生命期间定植于肌肉组织中,以准备响应损伤并修复骨骼肌³⁻⁸。在衰老过程中,具有功能的MuSC比例显著降低,阻碍了肌肉再生⁹⁻¹³。到目前为止,还没有以MuSC为靶标的治疗剂用于临床来对抗该再生下降。本发明中,我们鉴定了一种天然的免疫调节剂——前列腺素E2(PGE2),作为肌肉再生必需的MuSC功能的有效调节剂。我们发现PGE2受体——EP4,是体外MuSC增殖和小鼠体内移植所必需的。在老龄小鼠的MuSC中,PGE2通路被异常调节,这是由于细胞固有的分子缺陷——增加的前列腺素降解酶(15-PGDH)使PGE2失活。通过将MuSC短暂急性暴露于稳定的耐降解性PGE2——16,16-二甲基PGE2(dmPGE2)中,同时将MuSC移植至损伤的肌肉中,可克服该缺陷。明显地,单次肌内注射单独的dmPGE2足以加速再生,这通过损伤后内源MuSC数目和肌纤维尺寸的较早增加可以得到证实。此外,老龄小鼠的肌肉力量产生能力增加,其响应于锻炼诱导的再生和急性dmPGE2治疗方案。我们的发现给出了一种新的治疗指示,即PGE2可作为肌肉再生和力量的有效诱导剂。

[0150] 为了对抗肌肉再生潜能的下降,我们寻找了以MuSC为靶标的治疗剂,也即卫星细胞,一类致力于肌肉再生的干细胞群³⁻⁸。因为短暂炎症性和纤维生脂反应在肌肉再生中起着至关重要的作用¹⁴⁻¹⁷,我们试图鉴定由损伤诱导的炎症调节物,其能够克服衰老相关的MuSC功能下降。我们的转录组数据库分析揭示PGE2的Ptger4受体(严重炎症期间的一种天然和有效的脂质调节剂¹⁸)在新鲜分离的MuSC上以高水平表达。在肌肉组织溶解产物中,通过虎蛇毒素注射或冷冻损伤的标准损伤范例,我们在幼龄(2-4个月)小鼠肌肉损伤后3天检测到PGE2水平急剧增加(图1A和图5A),以及其合成酶——Ptges和Piges2的随之上调(图1B)。该早期瞬时时间窗口符合有充分文件记录的损伤后MuSC扩增动力学和炎症细胞因子积累^{8,15,16}。为了确定PGE2处理是否增强MuSC行为,我们通过FACS从幼龄小鼠(2-4个月)⁶的后肢肌肉纯化了MuSC,并将其接种至水凝胶上,采用12kpa的刚度以维持干细胞功能¹⁹。我们发现PGE2(10ng/ml)使由EDU掺入测定的细胞分裂(图1B-1D)增加,且1周后,急性暴露于PGE21天诱导了MuSC数目相对于对照增加了6倍(图1C)。

[0151] 已知PGE2通过4种G-蛋白偶联受体(Ptger1-4;EP1-4)^{18,20}进行传导信号,但MuSC中这些受体的表达先前未被描述。对不同受体(Ptger1-4)的转录水平分析揭示了PGE2处理MuSC后上调的仅有受体Ptger1和Ptger4(图5E)。PGE2刺激的MuSC具有升高的胞内cAMP^{18,20},证实了PGE2通过EP4传导信号来促进增殖和干细胞转录状态(图5F-5H)。在EP4拮抗剂——ONO-AE3-208的存在下,PGE2的增殖诱导被钝化(图1D)。然而,PGE2对EP4的特异性最明显地显示于cre-介导的条件性消融后缺少受体的MuSC中(图1E-1G和图5I-5J)。确实,即使在富含生长因子的培养基存在下,这些无EP4的MuSC也不能增殖。最后,我们发现通过暴露于含有活性炭吸附处理的血清的培养基中MuSC生长被阻止²¹,而加入PGE2后发生分裂(图1H和图5K)。因此,PGE2/EP4是MuSC增殖所必需的且足以使MuSC增殖。

[0152] 我们试图确定PGE2是否能够改善先前针对衰老MuSC报导的肌肉再生缺陷⁹⁻¹³。与幼龄小鼠肌肉(2-4个月)相反,衰老肌肉(18-20个月)的虎蛇毒素损伤未引起PGE2合成的增加。相反,损伤后衰老肌肉中的稳态PGE2水平保持不变(图2A),且显著高于年轻肢胫骨前肌(TA)肌肉(图2B)。我们假设由于分解代谢缺陷,衰老肌肉的PGE2可能是功能异常的。确实,在我们通过质谱法分析年轻和衰老TA肌肉组织中存在的PGE2时,发现衰老肌肉组织中失活

形式的13,14-二氢-15-酮PGE2 (PGEM) 的相对量显著增加(图2C-2D和图6A-6C)。这已证实是由于在将PGE2转化为其失活形式的初始步骤中,编码PGE2降解酶(15-PGDH)的mRNA水平具有相应的7倍增加(图2E)。相反地,前列腺素转运蛋白(PGT)、PGE2合成酶和EP4受体的相对水平在年轻和衰老的MuSC之间无差异(图7A-7C)。另外,当将衰老MuSC暴露于1天脉冲(pulse)的PGE2或15-PGDH的抑制剂(SW033291)²²时,15-PGDH的作用被克服,且观察到增殖和Pax7表达维持的特性增加(图2F和图7D)。与年轻MuSC相似,衰老MuSC在含有活性炭吸附处理的血清的培养基中不能增殖,但单独添加PGE2即可恢复(图2G)。我们推测在衰老MuSC中,PGE2通路调节异常,这是由于细胞固有的分子缺陷——升高的15-PGDH,其在培养中可通过急性暴露于PGE2或SW来克服(图2H)。

[0153] 因为衰老MuSC为异源的¹⁰,我们试图确定PGE2在单细胞水平上的影响。克隆分析可以揭示作为整体的群体分析所掩盖的差异。相应地,我们在短暂(1天)暴露于PGE2的单一衰老MuSC和未处理对照MuSC的水凝胶“微孔”中进行了长期延时显微镜检查。收集了48小时时间段内的数据,然后使用我们先前描述的用于细胞追踪和谱系重建的Baxter算法^{10,19,23}进行分析。我们观察到响应于PGE2的积累细胞数目显著增加,对于最强的克隆体,跨越了6个代次(图2I-2J)。PGE2处理后每个克隆的细胞数目显著增加,这是由于增殖的显著增加(图2I-2J和图7E-7F),其伴随着细胞死亡的大幅减少(图2J和图7E-7G)。这些协同效应造成了观察到的响应于PGE2的衰老MuSC数目增加。

[0154] 为了测试以PGE2短暂处理年轻MuSC是否增加再生,我们将所培养的PGE2处理的MuSC移植至小鼠损伤的后肢肌肉中。为了以定量方式监测体内再生随时间的动态,我们利用了以前开发的用于监测移植后MuSC功能^{6,10,19}的灵敏且定量的生物发光成像(BLI)分析。从表达了GFP和荧光素酶的幼龄转基因小鼠(2-4个月)(GFP/Luc小鼠)中分离出MuSC,暴露于急性PGE2处理1天,第7天收获并移植。将相等数目的dmPGE2处理和对照MuSC(250个细胞)移植至幼龄(2-4个月)NOD-SCID小鼠的损伤后肢。在用PGE2急性处理后,通过BLI测定年轻MuSC再生能力增加了一个数量级(图3A)。相反地,在移植了4倍多数量的培养的因条件性清除而缺少EP4受体的MuSC后(图3B),最初检测到的BLI信号逐渐下降至低于显著性阈值的水平(图3B)。

[0155] 此外,当在肌肉干细胞特异性缺失EP4(Pax7^{CreERT2};EP4^{f1/f1})的小鼠模型中进行虎蛇毒素损伤时(图9A-9B),肌肉再生受损,这可通过胚胎肌球蛋白重链(eMHC)阳性纤维增加的数目观察到(图9C-9D)。这伴随着在再生时间点最后(第21天)评估的Pax7^{CreERT2};EP4^{f1/f1}组中小鼠纤维横切面面积的减小(图9E)。在损伤后第14天还检测到力量输出(强直)的显著减少(图9F-9G)。因此,PGE2通过EP4受体的信号传导是MuSC体内再生所必需的。

[0156] 为了测试直接注射PGE2而未经培养是否能够有效促进体内再生,我们共同注射了PGE2和新鲜分离的MuSC。对于所有随后的体内注射实验,我们使用经修饰的更稳定形式的PGE2——16,16-二甲基PGE2(dmPGE2)²⁴。我们假设对于衰老MuSC实验,经修饰的15-PGDH对抗性dmPGE2的递送特别重要,因为在衰老MuSC中15-PGDH显著升高(图2E)²⁴。使用dmPGE2,我们观察到相对于对照,年轻和衰老的MuSC移植显著增加,其响应于虎蛇毒素损伤(一种被广泛接受的干细胞功能的严格测试)而进一步增加(图3C-3D)。因此,dmPGE2与MuSC细胞群的一起递送足以促进再生。

[0157] 我们假定单独PGE2的递送能够刺激肌肉再生。为了检测这一假设,以心脏毒素对

幼龄小鼠的肌肉制造损伤,并在3天后将大剂量的dmPGE2注射至幼龄小鼠的后肢肌肉。损伤后14天,我们在基膜下和肌纤维顶部的经典卫星细胞微环境处观察到内源表达PAX7的MuSC有所增加($60 \pm 15\%$) (图4A-4B),然而dmPGE2在无损伤时没有影响。此外,在较早的时间点,肌纤维的分布趋向于较大的尺寸,其以用于肌纤维分析的Baxter算法得到的横切面面积来评估,表明PGE2可使再生加速(图4C-4D和图8A-8B)。另外,我们通过荧光素酶表达,采用转基因小鼠模型—— $Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc$,追踪了对内源MuSC的损伤和dmPGE2的响应(图4E)。BLI数据与组织学数据一致(图4F-4G)。

[0158] 我们检测了注射吲哚美辛(一种非甾体抗炎剂(NSAID)和减少PGE2合成的COX2抑制剂)对肌肉再生的影响。在心脏毒素损伤后3天,在将吲哚美辛注射至相同 $Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc$ 小鼠模型的后肢肌肉后,我们观察到荧光素酶活性的显著降低,表明肌肉干细胞活化和再生的损伤(图10A-10B)。相比在损伤后第14天评估的对照组,注射吲哚美辛至心脏毒素损伤的肌肉还引起颤搐力的显著损失(图10C)。在老龄小鼠中,在单次dmPGE2注射后,在损伤后14天我们还检测到内源MuSC数目的大幅增加($24 \pm 2\%$) (图4H-4I)和肌纤维尺寸的随之增加(图4J-4K)。因此,仅暴露于dmPGE2影响内源修复的程度和时间过程。

[0159] 作为最后的测试,我们测定了通过下坡式跑步机运动诱导的天然损伤后,dmPGE2增强的再生是否能够引起肌肉力量的增加。在该情形下,通过在20度下降的下坡式跑步机上每天10分钟的跑步来造成损伤²⁵。在第一周期间,治疗组中的老龄小鼠连续跑了5天,且每天在锻炼后注射dmPGE2。在第二周期间,治疗组中的老龄小鼠连续跑了5天,但未接受另外的治疗(图4L)。比较了dmPGE2治疗和未治疗腓肠肌小鼠肌肉(GA)的比颤搐力和强直收缩力,发现二者均显著增加(图4M-4P)。因此,在锻炼诱导的损伤同时急性暴露于dmPGE2可以使衰老肌肉力量显著增加。

[0160] 我们发现了骨骼肌再生中PGE2的新的指示作用。PGE2对骨骼肌影响的先前研究已表明其可改变组织培养中的增殖、融合、蛋白质降解和成肌细胞的分化²⁶⁻³⁰。因此,这些研究不同于我们的研究,因为成肌细胞是已丧失了干细胞功能的祖细胞。卫星细胞(MuSC)对发展和再生至关重要^{3-8,31},且通过跑步或其他高强度锻炼,其在幼龄和老龄小鼠以及人体中的数目增加^{15,32-36}。已报导非甾体抗炎剂能够减弱锻炼诱导的MuSC增加^{15,32-36}。我们的数据提供了新的证据,表明有效肌肉再生的炎症早期瞬态波的有利效应¹⁵部分是由于PGE2及其受体EP4,其对MuSC增殖和移植而言是必需且足够的。对于造血、肝和结肠组织,递送15-PGDH抑制剂——SW033291(最近被发现能够增强再生)²²。明显地,PGE2及其类似物数十年来已被安全地应用于人类患者,例如用于诱导分娩³⁷,和促进造血干细胞抑制³⁸,这为其临床应用用于损伤后肌肉修复进行了准备。总之,我们的发现显示急性PGE2方案足以快速和强效地增强锻炼诱导的损伤的再生,并克服衰老相关的限制,使得力量增加。

[0161] 参考文献

[0162] 1 Di Monaco, M., Vailero, F., Di Monaco, R. & Tappero, R. Prevalence of sarcopenia and its association with osteoporosis in 313 older women following a hip fracture. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 52, 71-74 (2010).

[0163] 2 Ruiz, J. R. et al. Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *Bmj* 337, a439, doi:10.1136/bmj.a439 (2008).

[0164] 3 Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A. & Brack, A. S. The aged niche

disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 490,355-360,doi:10.1038/nature11438(2012) .

[0165] 4 Mauro,A.Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biocnem Cytol* 9,493-495(1961) .

[0166] 5 Montarras,D.et al.Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309,2064-2067,doi:10.1126/science.1114758(2005) .

[0167] 6 Sacco,A.,Doyonnas,R.,Kraft,P.,Vitorovic,S.&Blau,H.M.Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* 456,502-506, doi:10.1038/nature07384(2008) .

[0168] 7 Kuang,S.,Gillespie,M.A.&Rudnicki,M.A.Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell stem cell* 2,22-31,doi: 10.1016/j.stem.2007.12.012(2008) .

[0169] 8 Shi,X.&Garry,D.J.Muscle stem cells in development,regeneration,and disease. *Genes&development* 20,1692-1708,doi:10.1101/gad.1419406(2006) .

[0170] 9 Bernet,J.D.et al.p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nature medicine* 20,265-271,doi:10.1038/nm.3465(2014) .

[0171] 10 Cosgrove,B.D.et al.Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nature medicine* 20,255-264,doi: 10.1038/nm.3464(2014) .

[0172] 11 Price,F.D.et al.Inhibitor of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nature medicine* 20,1174-1181,doi:10.1038/nm.3655 (2014) .

[0173] 12 Sousa-Victor,P.et al.Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506,316-321,doi:10.1038/nature13013(2014) .

[0174] 13 Tierney,M.T.et al.STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal repair. *Nature medicine* 20,1182-1186,doi:10.1038/nm.3656(2014) .

[0175] 14 Arnold,L.et al.Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* 204,1057-1069,doi:10.1084/jem.20070075(2007) .

[0176] 15 Chazaud,B.Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling:application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol Cell Biol* 94,140-145,doi:10.1038/icb.2015.97(2016) .

[0177] 16 Joe,A.W.et al.Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature cell biology* 12,153-163,doi: 10.1038/ncb2015(2010) .

[0178] 17 Tidball,J.G.Mechanisms of muscle injury,repair,and

- regeneration. *Compr Physiol* 1,2029-2062,doi:10.1002/cphy.c100092(2011).
- [0179] 18 Ricciotti, E. & FitzGerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31,986-1000 (2011).
- [0180] 19 Gilbert, P. M. et al. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 329,1078-1081,doi:10.1126/science.1191035(2010).
- [0181] 20 Korotkova, M. & Lundberg, I. E. The skeletal muscle arachidonic acid cascade in health and inflammatory disease. *Nature reviews. Rheumatology* 10, 295-303,doi:10.1038/nrrheum.2014.2(2014).
- [0182] 21 Smethurst, M. & Williams, D. C. Levels of prostaglandin E and prostaglandin F in samples of commercial serum used for tissue culture. *Prostaglandins* 13,719-722(1977).
- [0183] 22 Zhang, Y. et al. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* 348,aaa2340(2015).
- [0184] 23 Magnusson, K. E., Jalden, J., Gilbert, P. M. & Blau, H. M. Global linking of cell tracks using the Viterbi algorithm. *IEEE transactions on medical imaging* 34,911-929,doi:10.1109/TMI.2014.2370951(2015).
- [0185] 24 Ohno, H., Morikawa, Y. & Hirata, F. Studies on 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase with various prostaglandin analogues. *Journal of biochemistry* 84,1485-1494(1978).
- [0186] 25 Sacco, A. et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* 143,1059-1071,doi:10.1016/j.cell.2010.11.039(2010).
- [0187] 26 Baracos, V., Rodemann, H. P., Dinarello, C. A. & Goldberg, A. L. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever. *The New England journal of medicine* 308,553-558,doi:10.1056/NEJM198303103081002 (1983).
- [0188] 27 Beaulieu, D. et al. Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy. *Neurobiology of disease* 45, 122-129,doi:10.1016/j.nbd.2011.06.014(2012).
- [0189] 28 Mo, C., Romero-Suarez, S., Bonewald, L., Johnson, M. & Brotto, M. Prostaglandin E2: from clinical applications to its potential role in bone-muscle crosstalk and myogenic differentiation. *Recent patents on biotechnology* 6,223-229(2012).
- [0190] 29 Mo, C. et al. Prostaglandin E2 promotes proliferation of skeletal muscle myoblasts via EP4 receptor activation. *Cell cycle* 14,1507-1516,doi:10.1080/15384101.2015.1026520(2015).

[0191] 30 Rodemann, H.P. & Goldberg, A.L. Arachidonic acid, prostaglandin E2 and F2 alpha influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *J Biol Chem* 257, 1632-1638 (1982).

[0192] 31 Pawlikowski, B., Pulliam, C., Betta, N.D., Kardon, G. & Ojwin, B.B. Pervasive satellite cell contribution to uninjured adult muscle fibers. *Skeletal muscle* 5, 42, doi:10.1186/s13395-015-0067-1 (2015).

[0193] 32 Cramer, R.M. et al. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *The Journal of physiology* 558, 333-340, doi:10.1113/jphysiol.2004.061846 (2004).

[0194] 33 Darr, K.C. & Schultz, E. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *Journal of applied physiology* 63, 1816-1821 (1987).

[0195] 34 Dreyer, H.C., Blanco, C.E., Sattler, F.R., Schroeder, E.T. & Wiswell, R.A. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle & nerve* 33, 242-253, doi:10.1002/mus.20461 (2006).

[0196] 35 Mackey, A.L. et al. The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *Journal of applied physiology* 103, 425-431, doi:10.1152/jappphysiol.00157.2007 (2007).

[0197] 36 Paulsen, G., Mikkelsen, U.R., Raastad, T. & Peake, J.M. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise immunology review* 18, 42-97 (2012).

[0198] 37 Thomas, J., Fairclough, A., Kavanagh, J. & Kelly, A.J. Vaginal prostaglandin (PGE2 and PGF2 α) for induction of labour at term. *The Cochrane database of systematic reviews* 6, CD003101, doi:10.1002/14651858.CD003101.pub3 (2014).

[0199] 38 North, T.E. et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. *Nature* 447, 1007-1011 (2007).

[0200] 方法

[0201] 小鼠

[0202] 我们进行的所有实验和方案均遵守斯坦福大学和实验动物护理管理小组 (APLAC) 的制度指导。我们从美国国家老龄化研究所 (NIA) 获得了野生型老龄 C57BL/6 (18-20 个月) 小鼠以用于衰老肌肉研究, 而幼龄野生型 C57BL/6 小鼠获自 Jackson 实验室。按先前所述产生双转基因 GFP/luc 小鼠¹。简言之, FVB 品系保持了表达受普遍存在的受 Actb 启动子调控的萤火虫荧光素酶 (luc) 转基因小鼠。C57BL/6 品系保持了表达受普遍存在的受 UBC 启动子调控的绿色荧光蛋白 (GFP) 的转基因小鼠。我们将来自 GFP/luc 的细胞用于 NOD-SCID (Jackson Laboratory) 受体小鼠的同种异体移植实验。EP4^{flox/flox} 小鼠由 K. Andreasson (Stanford University)² 友情赠与。双转基因 Pax7^{CreERT2}; Rosa26-LSL-Luc 通过将获自 Jackson 实验室的 Pax7^{CreERT2} 小鼠 (保存编号 017763)³ 和获自 Jackson 实验室的 Rosa26-LSL-Luc (保存编号

005125)⁴杂交而产生。我们通过合适的基于PCR的策略验证了这些基因型。来自转基因品系的所有小鼠均为幼龄。对于所有品系,幼龄小鼠为2-4个月的年龄,且老龄小鼠为18-20个月的年龄。这些研究中使用的的所有小鼠均为雌性。

[0203] 肌肉干细胞分离

[0204] 我们按先前所述^{1,5,6}分离和富集肌肉干细胞。简言之,温和的胶原酶消化和通过MAC离解器切割使得众多的单纤维被离解,接着进行分散酶消化来从其微环境释放出单核细胞。随后,使用磁珠柱(Miltenyi)来减少细胞混合物中表达造血谱系和非肌细胞(CD45⁻/CD11b⁻/CD31⁻)。剩下的细胞混合物接着进行FACS分析来分选出共表达CD34和 α 7-整合素标志物的MuSC。我们使用FlowJo v10.0生成和分析流式细胞散点图。对于每次分选,我们将来自至少3只独立的供体雌性小鼠的MuSC(每只~5,000个)合并在一起。

[0205] 肌肉干细胞移植

[0206] 按先前所述^{1,5,6},我们在FACS分离之后或在从细胞培养物收集之后立即将250个MuSC(图3a、3c和3d)或1,000个MuSC(图3b)直接移植至受体小鼠的胫骨前肌(TA)肌肉。对于年轻MuSC研究,我们将来自GFP/luc小鼠(2-4个月的年龄)的细胞移植至后肢受辐照的NOD-SCID小鼠。对于衰老MuSC研究,按先前所述⁵,我们移植了来自老龄C57BL/6小鼠(18-20个月,NIH)的细胞,在移植前,该细胞在培养的第2天用luc-IRES-GFP慢病毒(GFP/luc病毒)转导24小时(详细信息参见下文“肌肉干细胞培养、处理和慢病毒感染”部分)。在移植肌肉干细胞之前,我们通过腹膜内注射氯胺酮(2.4mg/只小鼠)麻醉NOD-SCID受体小鼠。然后我们以单次剂量的18Gy辐照后肢,身体的其余部位用铅夹具屏蔽。我们在辐照2天内进行移植。

[0207] 按照所述(媒介物或PGE2处理的10ng/ml)的方法处理培养细胞,并从在37°C下以溶于PBS中的0.5%胰蛋白酶孵育2分钟的水凝胶培养物中收集细胞,并采用血球计计数。我们将细胞以所需的细胞浓度重悬于0.1%的明胶/PBS中,然后以10 μ l的量肌内注射至TA肌肉来进行移植(250个MuSC/TA)。对于新鲜MuSC移植,我们将分选的细胞与13nmol的16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(Tocris,目录号4027)或媒介物对照(PBS)共同注射。我们通过移植至相同小鼠对侧腿的TA肌肉比较了来自不同条件的细胞。移植后一个月,我们注射了10 μ l的虎蛇毒素(10 μ gml⁻¹;Latoxan,法国)来损伤受体肌肉和在体内激活MuSC。移植后8周,将小鼠安乐死并采集TA用于分析。

[0208] 生物发光成像

[0209] 按先前所述^{1,5,6},我们使用Xenogen-100系统进行生物发光成像(BLI)。简言之,我们使用异氟烷吸入将小鼠麻醉,并通过腹膜内注射120 μ L D-荧光素(0.1mmol kg⁻¹,复溶于PBS中;Caliper LifeSciences)。在荧光素注射后5分钟,我们使用60秒的曝光,以F_{停止}=1.0获取BLI。记录数码图像并使用Living Image软件(Caliper LifeSciences)进行分析。我们采用位于每只后肢上的一致目标区(ROI)进行分析图像来计算生物发光信号。我们以10⁴的辐射度(p s⁻¹cm⁻²sr⁻¹)值来计算生物发光信号,以确定移植阈值。该10⁴的辐射度阈值约等于先前报告的p/s的总流量阈值。该BLI阈值对应于一根或多根GFP+肌纤维的组织学检测^{1,5,6}。我们在移植后每周进行BLI成像。

[0210] 肌肉损伤

[0211] 我们采用了在肌内注射10 μ l的虎蛇毒素(10 μ g ml⁻¹;Latoxan)或心脏毒素(10 μ M;Latoxan)至TA肌肉的损伤模式。对于低温损伤,在TA肌肉的皮肤制造切口,并将在液氮中冷

冻过的铜探针施用至TA肌肉,维持3次间隔10秒,以使肌肉在每次施用冷冻探针之间可以解冻。当有指示时,在损伤后48小时,将16,16-二甲基前列腺素E2(dmPGE2)(13nmol,Tocris,目录号4027)或媒介物对照(PBS)注射至TA肌肉。将对侧TA用作内部对照。我们在损伤后14天采集组织用于分析。

[0212] 对于Pax7^{CreERT2};Rosa26-LSL-Luc小鼠实验,我们利用5次连续的每日腹膜内注射他莫昔芬来激活Pax7启动子控制下的荧光素酶表达来治疗小鼠。在最后一次他莫昔芬注射后1周,对小鼠肌内注射10 μ l的心脏毒素(10 μ M;Latoxan),我们将这一天指定为测定的第0天。3天后,将13nmol dmPGE2(13nmol)或媒介物对照(PBS)注射至TA肌肉。将对侧TA用作内部对照。在损伤后第3天、第7天、第10天和第14天测定生物发光。

[0213] 组织的组织学

[0214] 我们按照先前所述^{5,6},采集和制备了受体TA肌肉组织以用于组织学分析。我们以抗层粘连蛋白(Millipore,克隆A5,目录号05-206,1:200)和抗-PAX7(Santa Cruz Biotechnology,目录号sc-81648,1:50)第一抗体孵育横切面,接着以AlexaFluor第二抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories,1:200)孵育。我们以DAPI(Invitrogen)将核染色。我们利用配有Plan NeoFluar 10x/0.30NA或20x/0.75NA物镜(Carl Zeiss)和ORCA-ER数码相机(Hamamatsu Photonics)的AxioPlan2落射式荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging),通过SlideBook(3i)软件控制,来获取图像。使用Adobe Photoshop对图像进行了裁剪,并对来自相同实验的所有图进行一致的对比度调整。复合图使用Adobe Illustrator生成。我们使用MetaMorph图像分析软件(Molecular Devices)分析了PAX7阳性细胞的数目,采用能够鉴定纤维的用于肌纤维分析的Baxter算法分析了纤维面积,并将图中的纤维分割以分析每根纤维的面积。对于PAX7的定量,我们检测了TA上跨越至少2mm深度的连续切面。对于纤维面积,对如上的每只小鼠捕获了至少10个视场的层粘连蛋白染色的肌纤维横切面,包含超过400根肌纤维。数据分析是盲化的。进行图像获取和评分的研究者不知道所分析样品组的处理条件。

[0215] 水凝胶制作

[0216] 我们从按先前所述⁶合成的PEG前体制备了聚乙二醇(PEG)水凝胶。简言之,我们通过使用已发表的可获得12-kPa(杨氏模量)刚度的水凝胶的配方来制备了水凝胶,其厚度为1mm,这是在培养物中培养MuSC和保持干细胞生命的最优条件⁶。按先前所述⁶,我们制备了12-kPa的水凝胶微孔阵列以用于克隆增殖实验。我们切割和粘贴所有水凝胶来覆盖12孔或24孔培养板的表面。

[0217] 肌肉干细胞培养、处理和慢病毒感染

[0218] 分离后,我们将MuSC重悬于包含DMEM/F10(50:50)、15%FBS、2.5ng ml⁻¹纤维母细胞生长因子-2(FGF-2,也称为bFGF)和1%盘尼西林-链霉素的肌源性细胞培养基中。我们以500个细胞/cm²表面积的密度接种MuSC悬液。我们将细胞培养物保持在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下,并每天更换培养基。对于PGE2、15-PGDH抑制剂和EP4受体拮抗剂处理的研究,在首个24小时,我们向在胶原包被盘上培养的MuSC中加入1-200ng/ml的前列腺素E2(Cayman Chemical)(除非在图例中有明确说明,10ng/ml是使用的标准浓度),和/或1 μ M EP4拮抗剂(ONO-AE3-208,Cayman Chemical),或1 μ M 15-PGDH抑制剂(SW033291,Cayman Chemical)。然后将细胞进行胰蛋白酶化,并将细胞重新接种到水凝胶上,额外再培养6天。所有处理均与其溶剂

(DMSO) 媒介物对照进行比较。对于吸附处理的血清测定,我们将分离的MuSC重悬于包含DMEM/F10(50:50)、15%活性炭吸附处理的FBS(Gibco,目录号12676011)、 2.5 ng ml^{-1} bFGF和1%盘尼西林-链霉素的培养基中。当图片中有注释时,我们向吸附处理的血清细胞培养基中额外添加了 $1.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 胰岛素(Sigma,10516)和 $0.25\text{ }\mu\text{M}$ 地塞米松(Sigma,D8893)。这些实验中MuSC培养于水凝胶上,且在每次更换培养基(每两天)时向培养物中添加媒介物(DMSO)或 10 ng/ml 的PGE2(Cayman Chemical)。7天后测定增殖(见下面)。

[0219] 我们在培养1周后进行所有MuSC培养测定和移植,除非另有说明。如前所述³,对于衰老MuSC的移植研究,我们用编码延长因子-1 α 启动子驱动的luc-IRES-GFP的慢病毒(GFP/luc病毒)感染培养的MuSC 24小时。对于EP4^{f/f} MuSC研究,我们按上述(肌肉干细胞分离)分离了MuSC,并以GFP/luc病毒感染所有细胞,并将其中的一部分用编码pLM-CMV-R-Cre的慢病毒(mCherry/Cre病毒)共感染24小时。pLM-CMV-R-Cre由Michel Sadelain赠与(Addgene质粒编号27546)⁷。我们将衰老MuSC(250个细胞)或EP4f/f MuSCs(1,000个细胞)移植至幼龄(2-4个月)NOD-SCID受体小鼠的经18-gy辐照的TA。对于体外增殖测定,注射后将EP4^{f/f} MuSC接种于水凝胶上,并用媒介物(DMSO)或 10 ng/ml PGE2处理24小时,并在3天后测定增殖。在注射后48小时,使用倒置荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging),测定细胞的GFP和/或mCherry表达。MuSC是通过FACS从小鼠中新鲜分离的,并培养最长1周的时间,因此未对支原体感染进行评估。

[0220] 增殖分析

[0221] 为了分析增殖,我们采用了3种不同的分析(血球计、VisionBlue和EdU)。对于每一种,我们以500个细胞/ cm^2 表面积的密度将MuSC接种于平的水凝胶(血球计和VisionBlue)或胶原包被的板上(EdU测定)。对于血球计细胞数计数,我们通过将细胞溶于PBS中的0.5%胰蛋白酶孵育5分钟,在所示的时间点采集细胞,并使用血球计对其进行至少3次的定量测定。另外,我们使用VisionBlue Quick细胞活力荧光测定试剂盒(BioVision,目录号K303)作为培养细胞生长的读取值。简言之,我们将MuSC与10%VisionBlue在培养基中孵育3小时,并在荧光板读取仪(Infinite M1000PRO, Tecan)上测量在 $\text{Ex}=530\text{-}570\text{ nm}$, $\text{Em}=590\text{-}620\text{ nm}$ 处的荧光强度。我们使用Click-iT EdU Alexa Fluor 555成像试剂盒(Life Technologies)测定增殖。简言之,我们用EdU($20\text{ }\mu\text{M}$)孵育活细胞1小时,然后固定,并根据厂商指导对核染色,并利用抗成肌素(Santa Cruz,目录号sc576,1:250)来测定分化。我们利用DAPI(Invitrogen)复染核。我们利用配置有Plan NeoFluar 10x/0.30NA或20x/0.75NA物镜(Carl Zeiss)和ORCA-ER数码相机(Hamamatsu Photonics)的AxioPlan2落射式荧光显微镜(Carl Zeiss Microimaging),通过SlideBook(3i)软件控制,来获取图像。我们使用MetaMorph图像分析软件(Molecular Devices)对EdU阳性细胞进行定量。数据分析是盲化的,其中进行细胞评分的研究者不知道所分析样品组的处理条件。

[0222] 克隆肌肉干细胞增殖和命运分析

[0223] 按先前所述^{5,6},我们通过延时显微镜测定了克隆肌肉干细胞的增殖。简言之,我们用PGE2(Cayman Chemical)或媒介物(DMSO)处理分离的衰老MuSC 24小时。在水凝胶上生长5天后,将细胞以500个细胞/ cm^2 表面积的密度重新接种于具有 $600\text{ }\mu\text{m}$ 直径的水凝胶微孔中。对于延时显微镜检查,我们监测了从12小时开始(第0天)至接种后2天的具有单细胞的那些孔中的细胞增殖,并使用具有自定义环境控制室和电动平台的PALM/AxioObserver Z1系统

(Carl Zeiss MicroImaging),以10×放大倍数,每3分钟记录图像。我们在采集时间间隔之间每隔一天更换培养基。我们采用用于细胞追踪和谱系重建的Baxter算法分析了时间推移图顺序,以鉴定和追踪单细胞并生成谱系树^{5,6,8-10}。

[0224] 基于相衬边界和运动性的维持或丧失,以时间推移顺序区分了活细胞和死细胞。我们发现这两种条件下的增殖(分裂)和死亡速率随时间而改变。因此,我们分别估计了第1个和第2个24小时间隔的速率。使用⁶中描述的方程式来估计值,且列于表1中。我们给出了 p_{24} 和 p_{48} 这两个间隔的增殖速率以及相应的死亡速率 d_{24} 和 d_{48} 。例如,在处理条件下,第二个24小时间隔期间的增殖速率为5.38%/小时。表1(如下)显示了两种条件下的增殖速率和死亡速率在第一个时间间隔内类似,而实验最后细胞数目的差异是由于第二个时间间隔期间分裂速率和死亡速率的差异导致的。两个时间间隔内模拟的细胞计数通过下式给出:

$$[0225] \quad c(t) = \begin{cases} c_0 \exp((p_{24} - d_{24})t) & 0 \leq t \leq 24 \\ c(24) \exp((p_{48} - d_{48})(t - 24)) & 24 < t \leq 48 \end{cases}$$

[0226] 其中 c_0 为起始时的细胞数。图7F给出了模拟曲线对真实细胞计数的作图。表1.估计的每小时增殖速率和死亡率。

[0227]	p_{24}	p_{48}	d_{24}	d_{48}
DMSO	0.0488	0.0403	0.0045	0.0112
E2	0.0475	0.0538	0.0067	0.0012

[0228] 数据分析是盲化的。进行图像采集和评分的研究者不知道所分析样品组的处理条件。

[0229] 定量RT-PCR

[0230] 我们使用RNeasy微量试剂盒(Qiagen)从MuSC分离了RNA。对于肌肉样本,我们将组织在液氮中速冻,使用研钵和研杵将组织均质化,然后使用注射器和针研磨,接着使用Trizol(Invitrogen)分离RNA。我们使用SensiFASTTM cDNA合成试剂盒(Bioline)来自每个样本的总mRNA反转录了cDNA。我们使用SYBR Green PC Master Mix(Applied Biosystems)或TaqMan Assays(Applied Biosystems),在ABI 7900HT实时PCR系统(Applied Biosystems)中,对cDNA进行RT-PCR。样本循环条件为:95°C 10min,然后在95°C 15s和60°C 1min的条件下进行40个循环。为了定量相对转录水平,我们使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来比较处理和未处理样本,并将结果以相对于Gapdh来表示。对于SYBR Green qRT-PCR,我们使用了以下引物序列:Gapdh,正向5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'(SEQ ID NO:1),反向5'-CCCTTTGGCTCCACCCT-3'(SEQ ID NO:2);Hpgd,正向5'-TCCAGTGTGATGTGGCTGAC-3'(SEQ ID NO:3),反向5'-ATTGTTACGCCTGCATTGT-3'(SEQ ID NO:4);Ptges,正向5'-GCTGTCATCACAGCCAGA-3'(SEQ ID NO:5),反向5'-CTCCACATCTGGTCACTCC-3'(SEQ ID NO:6);Ptges2,正向5'-CTCCTACAGGAAAGTGCCCA-3'(SEQ ID NO:7),反向5'-ACCAGGTAGGTCTTGAGGGC-3'(SEQ ID NO:8);Ptger1,正向5'-GTGGTGTGTCATCTGCT-3'(SEQ ID NO:9),反向,5'-CCGCTGCAGGGAGTTAGAGT-3'(SEQ ID NO:10),和Ptger2,正向5'-ACCTTCGCCATATGCTCCTT-3'(SEQ ID NO:11),反向5'-GGACCGGTGGCCTAAGTATG-3'(SEQ ID NO:12)。根据厂商说明书,利用TaqMan Universal PCR Master Mix reagent试剂盒(Applied Biosystems),使用TaqMan Assays(Applied Biosystems)定量测定样本中的

Pax7、成肌素、Slco2a1 (PGT)、Ptger3和Ptger4。转录水平以相对于Gapdh水平来表示。对于SYBR Green qPCR,使用Gapdh qPCR来标准化输入的cDNA样本。对于Taqman qPCR,多重qPCR使得靶标信号(FAM)能够通过其内部的Gapdh信号(VIC)单独地被标准化。

[0231] PGE2 ELISA

[0232] 收获肌肉,并用含有吲哚美辛(5.6 μ g/ml)的冰冷的PBS冲洗,并在液氮中速冻。将冷冻的样本在液氮中研成粉末。将粉末转移至装有500 μ l裂解缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、4mM CaCl₂、1.5% Triton X-100、蛋白酶抑制剂和微菌球核酸酶)的Eppendorf管中,然后使用组织匀浆器均质化。使用PGE2 ELISA试剂盒(R&D Systems,目录号KGE004B)测量上清液的PGE2水平,并以相对于通过BCA测定(BioRad)的总蛋白质来表示,为ng PGE2。每个样本测定两个重复,且在两个独立实验的每个样本中分别测定。

[0233] cAMP活性测定

[0234] 用DMSO(媒介物)或PGE2(10ng/ml)处理MuSC 1小时,并根据厂商优化的cAMP-Glo测定方案(Promega)测量环状AMP水平。每个样本测定三个重复且在两个独立的实验中测定。

[0235] 流式细胞术

[0236] 我们测定了膜联蛋白V作为在最初的媒介物(DMSO)或PGE2(10ng/ml)急性(24小时)处理后于水凝胶上培养7天后MuSC凋亡的读取值。我们使用FITC膜联蛋白V凋亡检测试剂盒(Biolegend,目录号640914),根据厂商的方案进行分析。我们在FACS LSR II细胞计数器上使用共享FACS设备中的FACSDiva软件(BD Biosciences)分析细胞的膜联蛋白V,该设备是使用NIH S10共享仪器基金(S1GRR027431-01)购买的。

[0237] 质谱分析

[0238] 分析物:

[0239] 所有前列腺素标准品——PGF2 α ;PGE2;PGD2;15-酮PGE2;13,14-二氢15-酮PGE2;PGE2-D4;和PGF2 α -D9——均购自Cayman Chemical。对于PGE2-D4内标,3和4位置以总共4个氘原子进行标记。对于PGF2 α -D9,17、18、19和20位置总共9个氘原子进行标记。

[0240] 校准曲线绘制:

[0241] 分析物原液(5mg/mL)用DMSO制备。用乙腈/水(1:1v/v)连续稀释这些原液来获得一系列的标准工作溶液,用于绘制校准曲线。通过以下方式绘制校准曲线:将10 μ L的每种标准工作溶液加入到200 μ L的均质化缓冲剂(丙酮/水1:1v/v;0.005%BHT来防止氧化)中,然后加入10 μ L内标溶液(PGF2 α -D9和PGE2-D4每种3000ng/mL)。校准曲线使用每组样本重新绘制。校准曲线范围:对于PGE2和13,14-二氢15-酮PGE2为0.05ng/mL至500ng/mL;对于PGD2和PGF2 α 为0.1ng/mL至500ng/mL;且对于15-酮PGE2为0.025ng/mL至500ng/mL。

[0242] 提取方案:

[0243] 提取方案选自Prasain et al.¹¹并进行修改,包含了丙酮蛋白质沉淀,然后进行2个步骤的液液萃取;其中后一步骤提高了LC-MS/MS的灵敏度。采用丁羟甲苯(BHT)和氮气(N₂)下的蒸发来防止氧化。

[0244] 收获固体组织,称重,并使用液氮速冻。将肌肉组织与均质化珠子和200 μ L均质化缓冲液共置于聚丙烯管中,并在FastPrep 24均质器(MPBiomedicals)中以6m/s的速度处理40秒。均质化后,将10 μ L内标溶液(3000ng/mL)加入到组织匀浆中,然后超声处理并震荡10

分钟。离心样本并将上清液转移至干净的离心管中。向样本中加入200 μ L己烷,然后震荡15分钟,接着离心。将样本在-80 $^{\circ}$ C下冷冻40分钟。从冷冻的下面水层倒出己烷层并丢弃。融化后,向底部水层加入25 μ L 1N的甲酸,并将样本涡旋振荡。对于第二次提取,往水相加入200 μ L氯仿。将样本摇晃15分钟以确保完全提取。通过离心分层。将下面的氯仿层转移至新的eppendorf管,并在氮气下,于40 $^{\circ}$ C蒸发至干燥。将干燥的残留物于100 μ L乙腈/10mM乙酸铵中复溶(2:8v/v),并通过LC-MS/MS进行分析。

[0245] LC-MS/MS:

[0246] 由于许多前列腺素是具有相同分子量的位置异构体且具有相似的片段化特征,因此色谱分离至关重要。针对每种分析物仔细挑选了两个SRM离子峰(transition)——一个是定量离子峰(quantifier)和另一个是定性离子峰(qualifier)。独特的定性物离子强度比率和保留时间对于鉴定靶标分析物至关重要。所有分析均通过负电喷射LC-MS/MS,采用LC-20AD_{XR}超快速液相色谱仪和8030三极串联四极杆质谱仪(Shimadzu)进行。HPLC条件为:Acquity UPLC BEH C18 2.1x100mm,1.7 μ m粒径填充柱,在50 $^{\circ}$ C下操作,流速为0.25mL/min。流动相由以下物质组成:A:0.1%醋酸水溶液,和B:0.1%醋酸乙腈溶液。洗脱程序:最初采用35%B保持5分钟,然后采用35%-40%的梯度3分钟,接着40%-95%3分钟;总运行时间为14分钟。注射体积为20 μ L。采用此HPLC条件,我们实现了目标分析物的基线分离。

[0247] 使用选择反应监测(SRM)进行定量分析。质量离子峰如下:PGD2:m/z 351.10 \rightarrow m/z 315.15(定量离子峰)和m/z 351.10 \rightarrow m/z 233.05(定性离子峰);PGE2:m/z 351.10 \rightarrow m/z 271.25(定量离子峰)和m/z 351.10 \rightarrow m/z 315.20(定性离子峰);PGF2 α :m/z 353.10 \rightarrow m/z 309.20(定量离子峰)和m/z 353.10 \rightarrow m/z 193.20(定性离子峰);15-酮-PGE2:m/z 349.30 \rightarrow m/z 331.20(定量离子峰)和m/z 349.30 \rightarrow m/z 113.00(定性离子峰);13,14-二氢15-酮PGE2:m/z 351.20 \rightarrow m/z 333.30(定量离子峰)和m/z 351.20 \rightarrow m/z 113.05(定性离子峰);PGE2-D4:m/z 355.40 \rightarrow m/z 275.20;和PGF2 α -D9:m/z 362.20 \rightarrow m/z 318.30。停留时间为20-30ms。

[0248] 使用LabSolutions LCMS(Shimadzu)进行定量分析。采用内标法进行定量:将PGE2-D4用作PGE2、15-酮PGE2和13,14-二氢15-酮PGE2定量的内标。PGF2 α -D9为PGD2和PGF2定量的内标。采用1/X²的权重因子,校准曲线在浓度范围内为线性的(R>0.99),其中X为浓度。反算的标准浓度偏差为标称值的 $\pm 15\%$,且定量下限(LLoQ)为 $\pm 20\%$ 。

[0249] 体内肌肉力量测量

[0250] 使老龄小鼠(18个月)在下坡式跑步机上跑步,持续连续2周。在第1周期间,小鼠每天跑步,持续5天,且在第6天和第7天休息。在第1周期间,在每次跑步机跑步后2小时,对每只小鼠的两条腿的每块(侧面中间的)腓肠肌(GA)肌肉注射一个剂量的PBS(媒介物对照)或13nM的dmPGE2(实验组)。在第2周期间,小鼠仅进行5天的跑步机跑步。使用Exer3/6(Columbus Instruments)进行跑步机跑步。小鼠在20度下坡式跑步机上跑步10分钟,开始速度为7米/min。3min后,将速度以1米/min增加至14米/min的最终速度。选择10分钟跑步时间,因为在独立的对照老龄小鼠组中,在12分钟的中值时间时观察到了力竭,其定义为尽管进行电刺激小鼠仍不能保持在跑步机上跑步。在第5周,根据先前发表的方案⁵,对GA肌肉进行力量测量。简言之,对于每只小鼠,通过制造切口来暴露GA。我们切断跟骨保留完整的跟腱,并使用薄金属钩将腱-骨复合物连接至300C-LR力传感器(Aurora Scientific)上。通过

用盐水(0.9%氯化钠)溶液定期加湿使肌肉和肌腱保持湿润。通过金属钳将下肢固定于膝盖下面,而不干扰至腿部的血流供应。在整个力量测量过程中,小鼠处于吸入麻醉剂(2%异氟烷)的状态,并通过加热灯来维持体温。在所有测量中,我们在预先确定的超大刺激电压下使用0.1-ms脉冲。采用递送2mA恒定电流(矩形脉冲宽度0.1ms)的双极电刺激袖(cuff)经由近端坐骨神经来刺激GA肌肉。对于颤搐力测量,以单次0.1-ms脉冲刺激GA肌肉,且对于强直收缩力测量,以连续150Hz的0.3s脉冲进行刺激。我们对每块肌肉进行了5次颤搐力测量,然后进行了5次强直收缩力测量,在每次测量之间恢复2-3分钟,每组n=5只小鼠。使用PCI-6251采集卡(National Instruments)收集数据,并在Matlab中分析。我们通过根据肌肉生理横切面面积(PCSA)对力测量值进行标准化来计算比力值,其在对照和实验PGE2处理组(表2)间之间是相似的。根据以下方程式¹²计算PCSA(测量为mm²):

$$[0251] \quad PCSA(\text{mm}^2) = [\text{质量}(\text{g}) \times \text{Cos}\theta] \div [(\rho(\text{g}/\text{mm}^3) \times \text{纤维长度}(\text{mm}))],$$

[0252] 其中 θ 为纤维的羽状角,且 ρ 为肌肉密度(0.001056g/mm³)。

[0253] 统计分析

[0254] 我们在至少3个独立的实验中进行了细胞培养实验,其中在每个独立实验中合并了3个生物学重复。总体而言,我们在至少两个独立的实验中进行了MuSC移植实验,其中每个条件总共至少3-5个移植物。实验采用成对t检验,其中对照样本来自相同的体外实验或来自体内对侧肢体肌肉。采用非参数曼-惠特尼检验来确定未处理(-)相对于处理(PGE或dmPGE2)组之间的显著性差异, $\alpha=0.05$ 。使用ANOVA或多重t检验来进行多重比较,采用Bonferroni校正或采用Fisher's检验来确定显著性水平,如附图说明中所示。除非另有说明,数据显示为均值 \pm s.e.m。

[0255] 方法参考文献:

[0256] 1 Sacco,A.,Doyonnas,R.,Kraft,P.,Vitorovic,S.&Blau,H.M.Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells.Nature 456,502-506,doi:10.1038/nature07384(2008) .

[0257] 2 Schneider,A.et al.Generation of a conditional allele of the mouse prostaglandin EP4receptor.Genesis 40,7-14,doi:10.1002/gene.20048(2004) .

[0258] 3 Murphy,M.M.,Lawson,J.A.,Mathew,S.J.,Hutcheson,D.A.&Kardon,G.Statellite cells,connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration.Development 138,3625-3637,doi:10.1242/dev.064162(2011) .

[0259] 4 Safran,M.et al.Mouse reporter strain for noninvasive bioluminescent imaging of cells that have undergone Cre-mediated recombination.Molecular imaging 2,297-302(2003) .

[0260] 5 Cosgrove,B.D.et al.Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles.Nature medicine 20,255-264,doi:10.1038/nm.3464(2014) .

[0261] 6 Gilbert,P.M.et al.Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture.Science 329,1078-1081,doi:10.1126/science.1191035(2010) .

- [0262] 7 Papapetrou, E.P. et al. Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29, 73-78, doi:10.1038/nbt.1717 (2011).
- [0263] 8 Chenouard, N. et al. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature methods* 11, 281-289, doi:10.1038/nmeth.2808 (2014).
- [0264] 9 Magnusson, K.E., Jalden, J., Gilbert, P.M. & Blau, H.M. Global linking of cell tracks using the Viterbi algorithm. *IEEE transactions on medical imaging* 34, 911-929, doi:10.1109/TMI.2014.2370951 (2015).
- [0265] 10 Maska, M. et al. A benchmark for comparison of cell tracking algorithms. *Bioinformatics* 30, 1609-1617, doi:10.1093/bioinformatics/btu080 (2014).
- [0266] 11 Prasain, J.K., Hoang, H.D., Edmonds, J.W. & Miller, M.A. Prostaglandin extraction and analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of visualized experiments: JoVE*, doi:10.3791/50447 (2013).
- [0267] 12 Burkholder, T.J., Fingado, B., Baron, S. & Lieber, R.L. Relationship between muscle fiber types and sizes and muscle architectural properties in the mouse hindlimb. *J Morphol* 221, 177-190, doi:10.1002/jmor.1052210207 (1994).
- [0268] 表2. 锻炼后5周衰老腓肠肌的生理横切面面积(PCSA)。

小鼠编号	腿	羽状角 θ (度)	余弦 (θ)	纤维长度 (mm)	GA 质量 (g)	PCSA (中间+ 侧面) (mm^2)
对照-1	左	21	0.93	6.88	0.18	23.13
	右	21	0.93	6.64	0.18	23.82
对照-2	左	26	0.90	4.03	0.16	33.79
	右	22	0.93	5.34	0.16	26.31
对照-3	左	21	0.93	4.52	0.15	29.34
	右	23	0.92	4.59	0.17	32.28
对照-4	左	24	0.91	5.07	0.14	23.89
	右	23	0.92	4.75	0.13	23.86
对照-5	左	19	0.95	6.07	0.16	17.75
	右	18	0.95	6.05	0.15	10.25
[0269] dmPGE2-1	左	12	0.98	7.60	0.25	30.47
	右	腱损伤	-	-	-	-
dmPGE2-2	左	12	0.96	4.85	0.16	30.56
	右	16	0.91	4.80	0.14	26.55
dmPGE2-3	左	14	0.97	5.89	0.17	26.52
	右	13	0.94	5.63	0.14	22.94
dmPGE2-4	左	14	0.97	6.67	0.14	19.29
	右	13	0.97	7.74	0.16	19.07
dmPGE2-5	左	11	0.98	5.56	0.17	28.42
	右	11	0.98	5.54	0.16	26.85
平均对照						25.09
平均 dmPGE2						25.63

[0270] 实施例2:前列腺素E2 (PGE2) 注射后肌肉力量增加

[0271] 本实施例显示了注射PGE2的老齡小鼠腓肠肌肌肉的比颤搐力增加。使老齡小鼠(18个月大)每天进行跑步机跑步直至力竭,为期10天。使用Exer3/6 (Columbus Instalments)进行跑步机跑步。小鼠在20度下坡式跑步机上跑步,起始速度为10米/分钟。3分钟后,速度以1米/分钟增加至最终20米/分钟的速度。力竭定义为尽管进行电刺激动物仍不能保持在跑步机上跑步。每次跑步机跑步后2h,每只小鼠的两侧腓肠肌肌肉均注射PBS (对照组)或3nM PGE2 (实验组)。使用300C-LR力量传感器(Aurora Scientific),采用预先确定的超大刺激强度下单次0.1ms脉冲,在最后一次跑步机跑步后4周来进行力测量。

[0272] 图4M-4N提供了单侧腓肠肌肌肉的代表性原始肌肉力量轨迹中。通过PCI-6251采集卡(National Instruments)记录肌肉力量和同步脉冲,并使用Matlab进行分析。图4O-4P显示了通过利用肌肉生理横断面积将力测量值标准化来计算比肌肉力值。比颤搐力值(kN/m^2)通过盒须图示出,其显示最小值、最大值和中值。每块肌肉进行5次重复测量。对照组, $N=4$, PGE2注射组, $n=5$ 。*表示通过双尾曼-惠特尼检验的统计显著性值 $p<0.005$ 。

[0273] VI. 示例性实施方案

[0274] 根据当前公开的主题提供的示例性的实施方案包括但不限于,权利要求和以下实施方案:

[0275] 1. 刺激分离的肌细胞群增殖的方法,所述方法包括:

[0276] 用化合物培养所述分离的肌细胞群,所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0277] 2.如实施方案1的所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为纯化的。

[0278] 3.如实施方案1或2所述的方法,其中所述分离的肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。

[0279] 4.如实施方案1-3中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0280] 5.如实施方案1-4中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群获自受试者。

[0281] 6.如实施方案5所述的方法,其中所述受试者患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病。

[0282] 7.如实施方案6所述的方法,其中所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病选自:急性肌肉损伤或外伤、软组织手部损伤、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、远端型肌营养不良(DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁和肌少症。

[0283] 8.如实施方案1-7中任一实施方案所述的方法,其中所述PGE2衍生物包括16,16-二甲基前列腺素E2。

[0284] 9.如实施方案1-7中任一实施方案所述的方法,其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PTG或SLCO2A1)的化合物、中和肽或中和抗体。

[0285] 10.如实施方案1-9中任一实施方案所述的方法,其中以所述化合物培养所述分离的肌细胞群包括将所述化合物急性地、间歇地或连续地暴露于所述分离的肌细胞群。

[0286] 11.促进受试者的肌细胞移植的方法,所述方法包括:

[0287] 以有效量的化合物培养分离的肌细胞群来促进所述受试者的所述肌细胞的移植,以及将所述培养的肌细胞给予所述受试者,所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0288] 12.如实施方案11所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为纯化的。

[0289] 13.如实施方案11或12所述的方法,其中所述分离的肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。

[0290] 14.如实施方案11-13中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0291] 15.如实施方案11-14中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为所述受试者自体的。

[0292] 16. 如实施方案11-14中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为所述受试者同种异体的。

[0293] 17. 如实施方案11-16中任一实施方案所述的方法,其中所述受试者患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病。

[0294] 18. 如实施方案17所述的方法,其中所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病选自:急性肌肉损伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、远端型肌营养不良(DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、线粒体性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁和肌少症。

[0295] 19. 如实施方案11-18中任一实施方案所述的方法,其中所述PGE2衍生物包括16, 16-二甲基前列腺素E2。

[0296] 20. 如实施方案11-18中任一实施方案所述的方法,其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PTG或SLC02A1)的化合物、中和肽或中和抗体。

[0297] 21. 如实施方案11-20中任一实施方案所述的方法,其中以所述化合物培养所述分离的肌细胞群包括将所述化合物急性地、间歇地或连续地暴露于所述分离的肌细胞群。

[0298] 22. 组合物,其包含分离的肌细胞群和化合物,所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0299] 23. 如实施方案22所述的组合物,其中所述分离的肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。

[0300] 24. 如实施方案22或23所述的组合物,其中所述分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0301] 25. 如实施方案22-24中任一实施方案所述的组合物,其还包含药学可接受的载体。

[0302] 26. 试剂盒,其包含如实施方案22-25中任一项所述的组合物和说明书。

[0303] 27. 用于在患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的受试者中再生肌细胞群的方法,所述方法包括:

[0304] 给予所述受试者治疗有效量的化合物和药学可接受的载体来增加所述受试者的肌细胞群和/或增强肌肉功能,所述化合物选自前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合。

[0305] 28. 如实施方案27所述的方法,其中所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病选自:急性肌肉损伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、远端型肌营养不良(DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、线粒体性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶

病质、压力诱导的尿失禁和肌少症。

[0306] 29. 如实施方案27或28所述的方法,其中所述肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。

[0307] 30. 如实施方案27-29中任一实施方案所述的方法,其中所述肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、肌细胞、成肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0308] 31. 如实施方案27-30中任一实施方案所述的方法,其中所述PGE2衍生物包括16, 16-二甲基前列腺素E2。

[0309] 32. 如实施方案27-30中任一实施方案所述的方法,其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括失活或阻断15-羟基前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PTG或SLCO2A1)的化合物、中和肽或中和抗体。

[0310] 33. 如实施方案27-32中任一实施方案所述的方法,其中给予所述化合物包括经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心内施用。

[0311] 34. 如实施方案27-33中任一实施方案所述的方法,其中所述化合物根据急性方案施用。

[0312] 35. 如实施方案27-34中任一实施方案所述的方法,其中给予还包括将分离的肌细胞群给予所述受试者。

[0313] 36. 如实施方案35所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为所述受试者自体的。

[0314] 37. 如实施方案35所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为所述受试者同种异体的。

[0315] 38. 如实施方案35-37中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为纯化的。

[0316] 39. 如实施方案35-38中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群在给予所述受试者之前用所述化合物培养。

[0317] 40. 如实施方案39所述的方法,其中所述分离的肌细胞群用所述化合物培养包括将所述化合物急性地、间歇地或连续地暴露于所述分离的肌细胞群。

[0318] 41. 如实施方案35-40中任一实施方案所述的方法,其中给予所述分离的肌细胞群包括将所述细胞注射或移植至所述受试者。

[0319] 42. 如实施方案35-41中任一项所述的方法,其中将所述分离的肌细胞群和所述化合物同时给予所述受试者。

[0320] 43. 如实施方案35-41中任一项所述的方法,其中将所述分离的肌细胞群和所述化合物依次给予所述受试者。

[0321] 44. 在有需要的受试者中预防或治疗与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的方法,所述方法包括:

[0322] 将以下物质给予所述受试者来预防或治疗所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病:(i) 治疗有效量的化合物和药学可接受的载体,所述化合物选自:前列腺素E2(PGE2)、PGE2前药、PGE2受体激动剂、减弱PGE2分解代谢的化合物、中和PGE2抑制的化合物、以上的衍生物、以上的类似物,和以上的组合,以及(ii)分离的肌细胞群。

[0323] 45. 如实施方案44所述的方法,其中所述PGE2衍生物包括16, 16-二甲基前列腺素

E2。

[0324] 46. 如实施方案44所述的方法,其中所述减弱PGE2分解代谢的化合物包括:失活或阻断15-羟基-前列腺素脱氢酶(15-PGDH)或者失活或阻断前列腺素转运蛋白(PTG或SLC02A1)的化合物、中和肽或中和抗体。

[0325] 47. 如实施方案44-46中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群包括骨骼肌细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、胚胎干细胞来源的肌细胞、诱导的多能干细胞来源的肌细胞、去分化的肌细胞,或以上的组合。

[0326] 48. 如实施方案44-47中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群包括肌肉干细胞、卫星细胞、成肌细胞、肌细胞、肌管、肌纤维,或以上的组合。

[0327] 49. 如实施方案44-48中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为纯化的。

[0328] 50. 如实施方案44-49中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群在给予所述受试者之前用所述化合物培养。

[0329] 51. 如实施方案50所述的方法,其中用所述化合物培养所述分离的肌细胞群包括将所述化合物急性地、间歇地或连续地暴露于所述分离的肌细胞群。

[0330] 52. 如实施方案44-51中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为所述受试者自体的。

[0331] 53. 如实施方案44-51中任一实施方案所述的方法,其中所述分离的肌细胞群为所述受试者同种异体的。

[0332] 54. 如实施方案44-53中任一实施方案所述的方法,其中给予所述化合物包括经口、腹膜内、肌内、动脉内、皮内、皮下、静脉内或心内施用。

[0333] 55. 如实施方案44-54中任一实施方案所述的方法,其中所述化合物根据急性方案施用。

[0334] 56. 如实施方案44-55中任一实施方案所述的方法,其中给予所述分离的肌细胞群包括将所述细胞注射或移植至所述受试者。

[0335] 57. 如实施方案44-56中任一实施方案所述的方法,其中将所述化合物和所述分离的肌细胞群同时给予所述受试者。

[0336] 58. 如实施方案44-56中任一实施方案所述的方法,其中将所述化合物和所述分离的肌细胞群依次给予所述受试者。

[0337] 59. 如实施方案44-58中任一实施方案所述的方法,其中所述受试者疑似患有与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病,或者处于发展与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病的风险。

[0338] 60. 如实施方案44-59中任一实施方案所述的方法,其中所述与肌肉创伤、损伤或萎缩相关的病症或疾病选自:急性肌肉损伤或外伤、手部软组织损伤、Duchenne型肌营养不良(DMD)、Becker型肌营养不良、肢带型肌营养不良、肌萎缩侧索硬化(ALS)、远端型肌营养不良(DD)、遗传性肌病、强直性肌营养不良(MDD)、线粒体性肌病、肌管性肌病(MM)、重症肌无力(MG)、充血性心力衰竭、周期性麻痹、多肌炎、横纹肌溶解、皮肌炎、癌性恶病质、AIDS性恶病质、心源性恶病质、压力诱导的尿失禁和肌少症。

[0339] 尽管为了清楚理解的目的,以说明和实例方式对上述发明进行了一些详细的描

述,本领域技术人员将理解的是,可以在所附权利要求的范围内作出一些改变和修饰。另外,本文中提供的每篇参考文献均通过引用整体并入本文中,其程度等同于就像每篇参考文献通过引入分别并入本文中。

- [0340] 非正式序列表
- [0341] Gapdh, 正向
- [0342] 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (SEQ ID NO:1)
- [0343] Gapdh, 反向
- [0344] 5'-CCCTTTTGGCTCCACCCT-3' (SEQ ID NO:2)
- [0345] Hpgd, 正向
- [0346] 5'-TCCAGTGTGATGTGGCTGAC-3' (SEQ ID NO:3)
- [0347] Hpgd, 反向
- [0348] 5'-ATTGTTACGCCTGCATTGT-3' (SEQ ID NO:4)
- [0349] Ptges, 正向
- [0350] 5'-GCTGTCATCACAGGCCAGA-3' (SEQ ID NO:5)
- [0351] Ptges, 反向
- [0352] 5'-CTCCACATCTGGGTCCTCC-3' (SEQ ID NO:6)
- [0353] Ptges2, 正向
- [0354] 5'-CTCCTACAGGAAAGTGCCCA-3' (SEQ ID NO:7)
- [0355] Ptges2, 反向
- [0356] 5'-ACCAGGTAGGTCTTGAGGGC-3' (SEQ ID NO:8)
- [0357] Ptger1, 正向
- [0358] 5'GTGGTGTCTGTCATCTGCT-3' (SEQ ID NO:9)
- [0359] Ptger1, 反向
- [0360] 5'CCGCTGCAGGGAGTTAGAGT-3' (SEQ ID NO:10)
- [0361] Ptger2, 正向
- [0362] 5'-ACCTTCGCCATATGCTCCTT-3' (SEQ ID NO:11)
- [0363] Ptger2, 反向
- [0364] 5'-GGACCGGTGGCCTAAGTATG-3' (SEQ ID NO:12)

序列表

	<110> 莱兰斯坦福初级大学评议会	
	<120> 利用前列腺素E2进行肌肉再生的组合物和方法	
	<130> 1038885	
	<140> PCT/US2017/020650	
	<141> 2017-03-03	
	<150> US 62/303, 979	
	<151> 2016-03-04	
	<150> US 62/348, 116	
	<151> 2016-06-09	
	<160> 12	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0001]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Gapdh正向引物	
	<400> 1	
	ttcaccacca tggagaaggc	20
	<210> 2	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Gapdh反向引物	
	<400> 2	
	cccttttggc tccaccct	18
	<210> 3	

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Hpgd正向引物	
	<400> 3	
	tccagtgtga tgtggctgac	20
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Hpgd反向引物	
	<400> 4	
[0002]	attgttcacg cctgcattgt	20
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Ptges正向引物	
	<400> 5	
	gctgtcatca caggccaga	19
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Ptges反向引物	

	<400> 6 ctccacatct gggtcactcc	20
	<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <221> gene <222> ()..() <223> 合成的Ptges2正向引物	
	<400> 7 ctcctacagg aaagtgccca	20
	<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0003]	<220> <221> gene <222> ()..() <223> 合成的Ptges2反向引物	
	<400> 8 accaggtagg tcttgagggc	20
	<210> 9 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220> <221> gene <222> ()..() <223> 合成的Ptger1正向引物	
	<400> 9 gtggtgtcgt gcatctgct	19
	<210> 10 <211> 20 <212> DNA	

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Ptger1反向引物	
	<400> 10	
	ccgctgcagg gagttagagt	20
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
[0004]	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Ptger2正向引物	
	<400> 11	
	accttcgcca tatgctcctt	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> gene	
	<222> ().. ()	
	<223> 合成的Ptger2反向引物	
	<400> 12	
	ggaccggtgg cctaagtatg	20

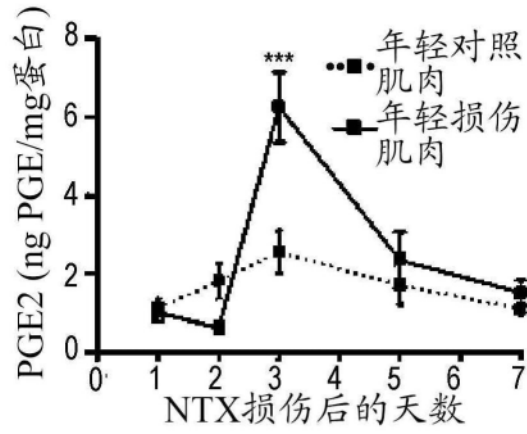


图1A

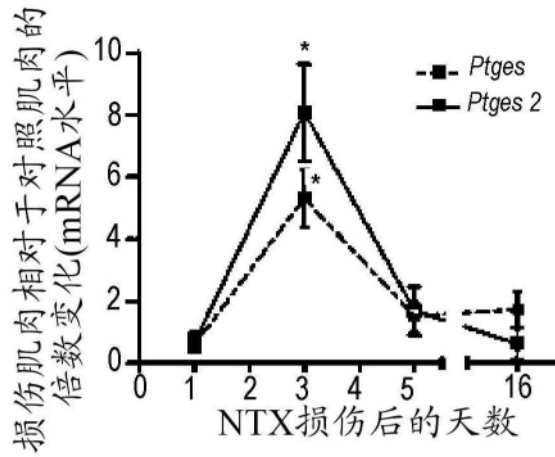


图1B

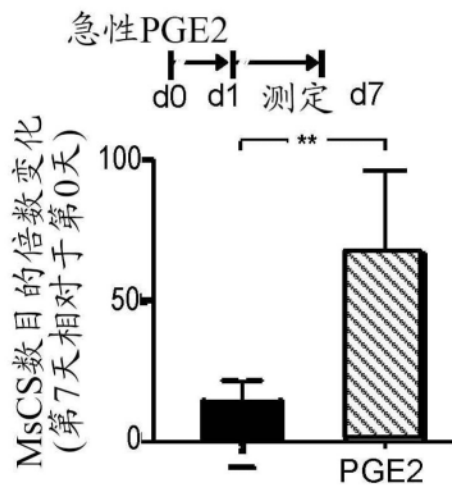


图1C

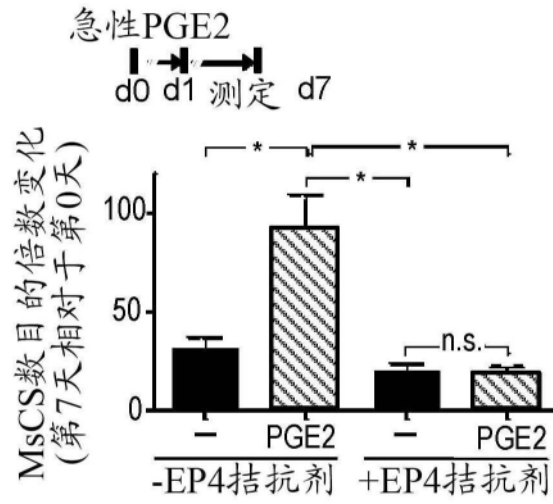


图1D

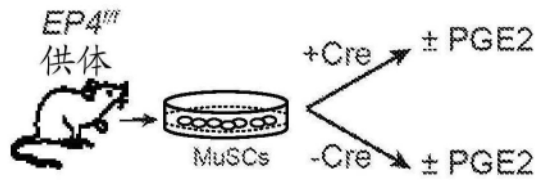


图1E

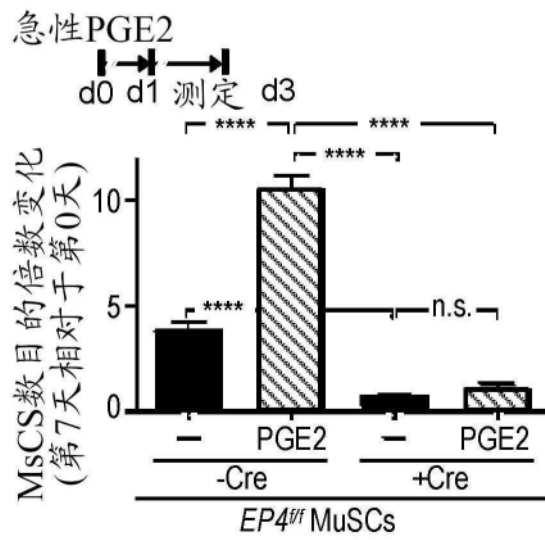


图1F

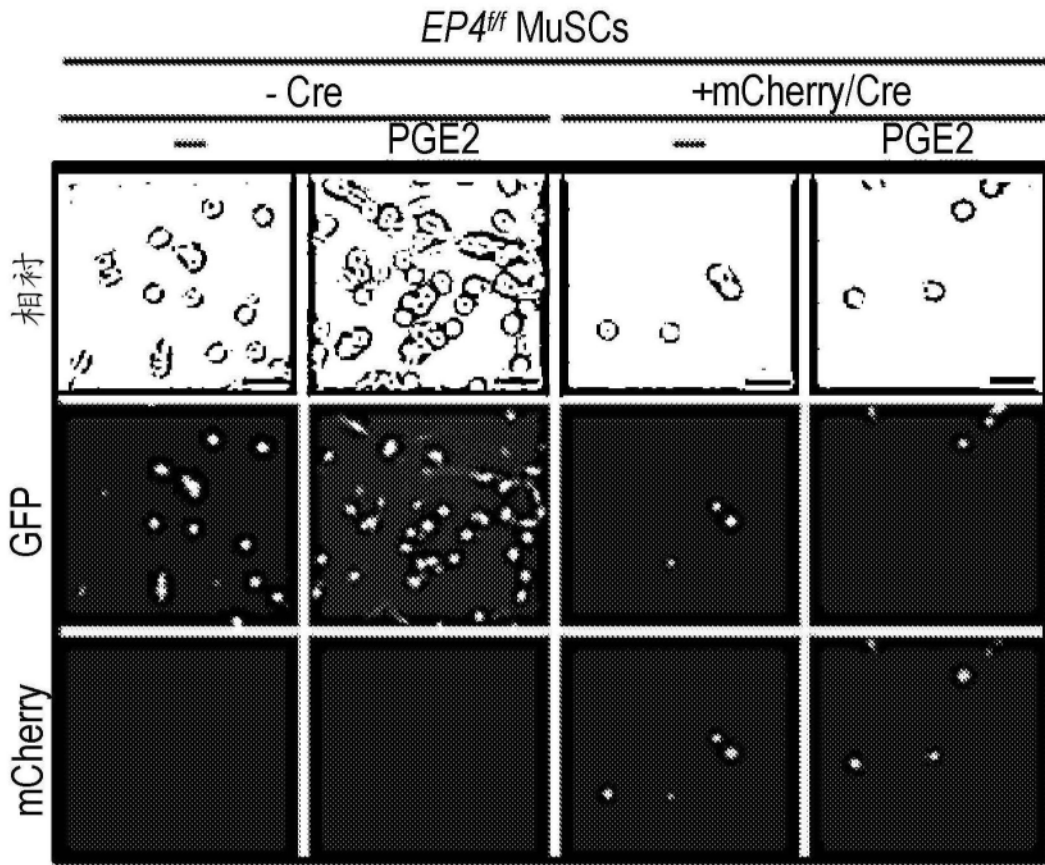


图1G

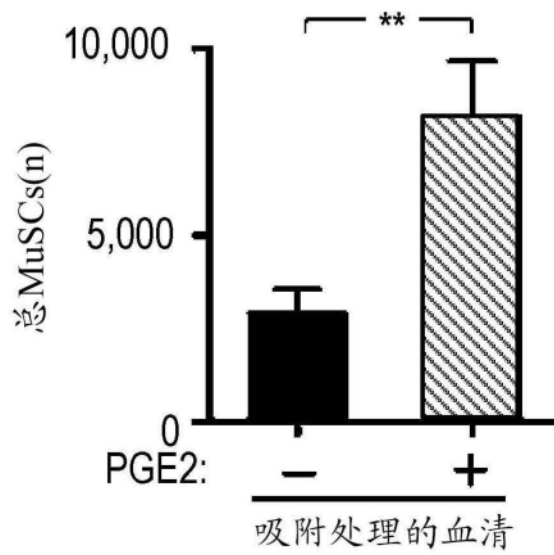


图1H

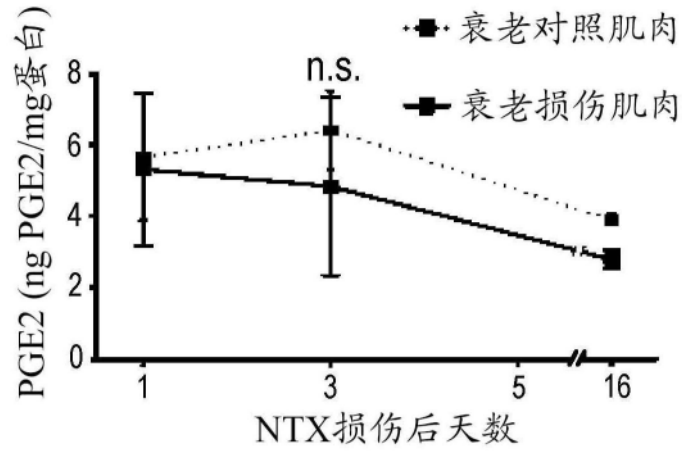


图2A

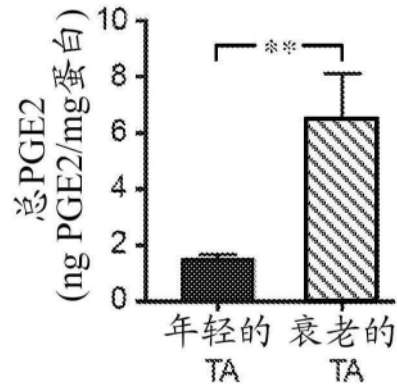


图2B

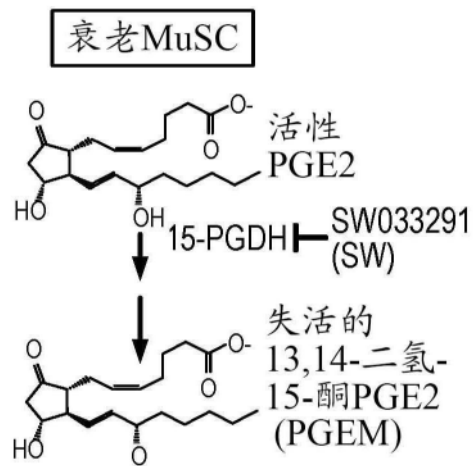


图2C

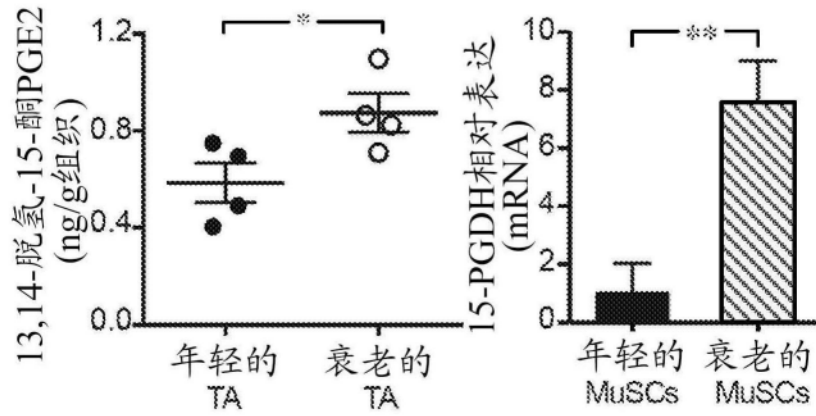


图 2D

图 2E

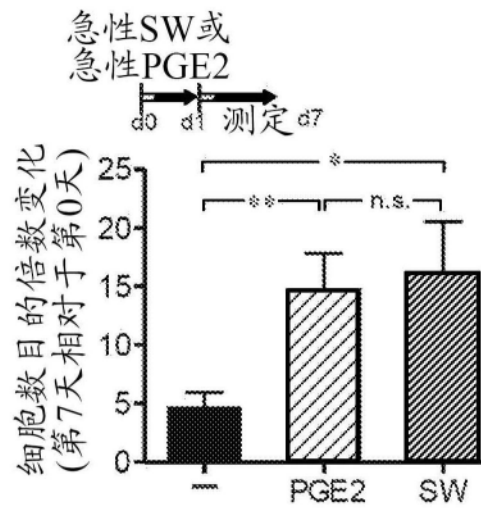


图2F

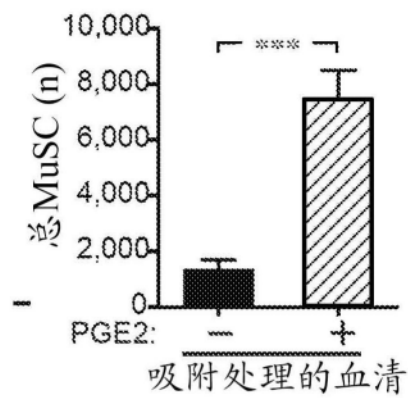


图2G

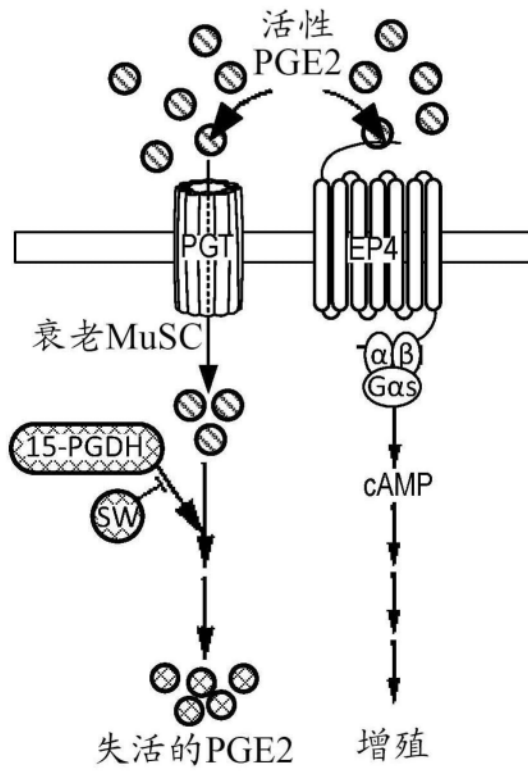


图2H

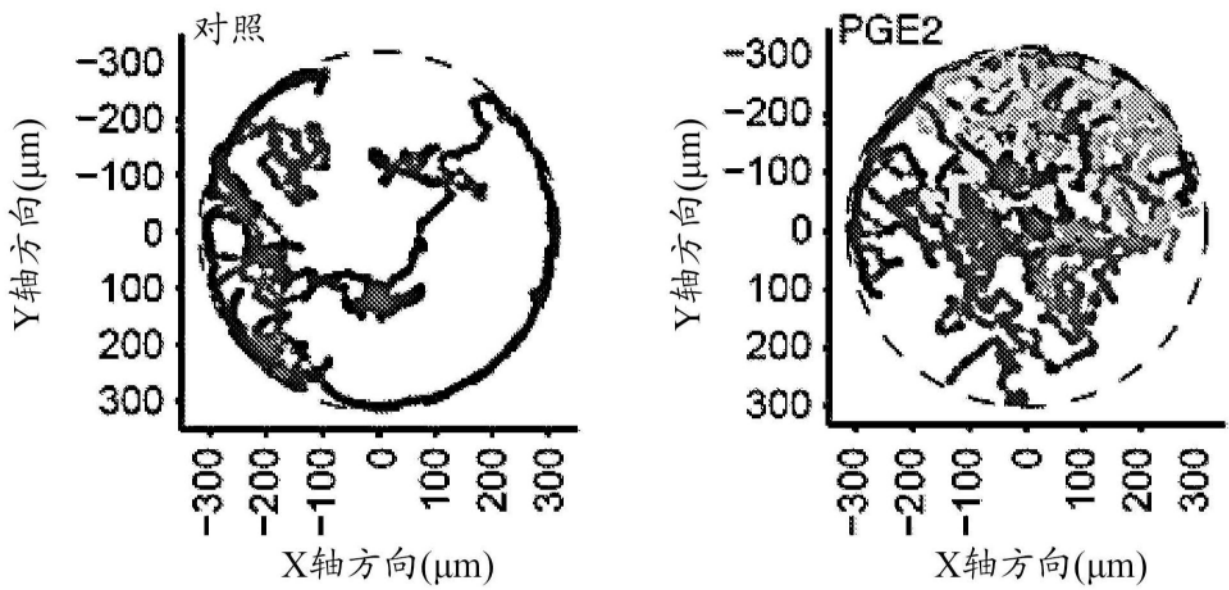


图2I

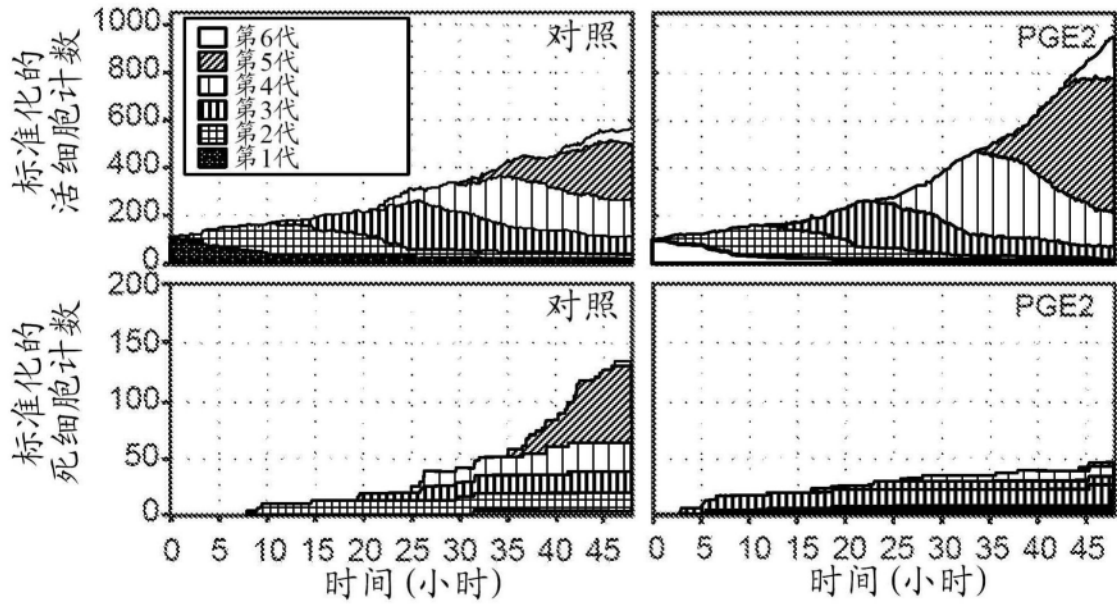


图2J

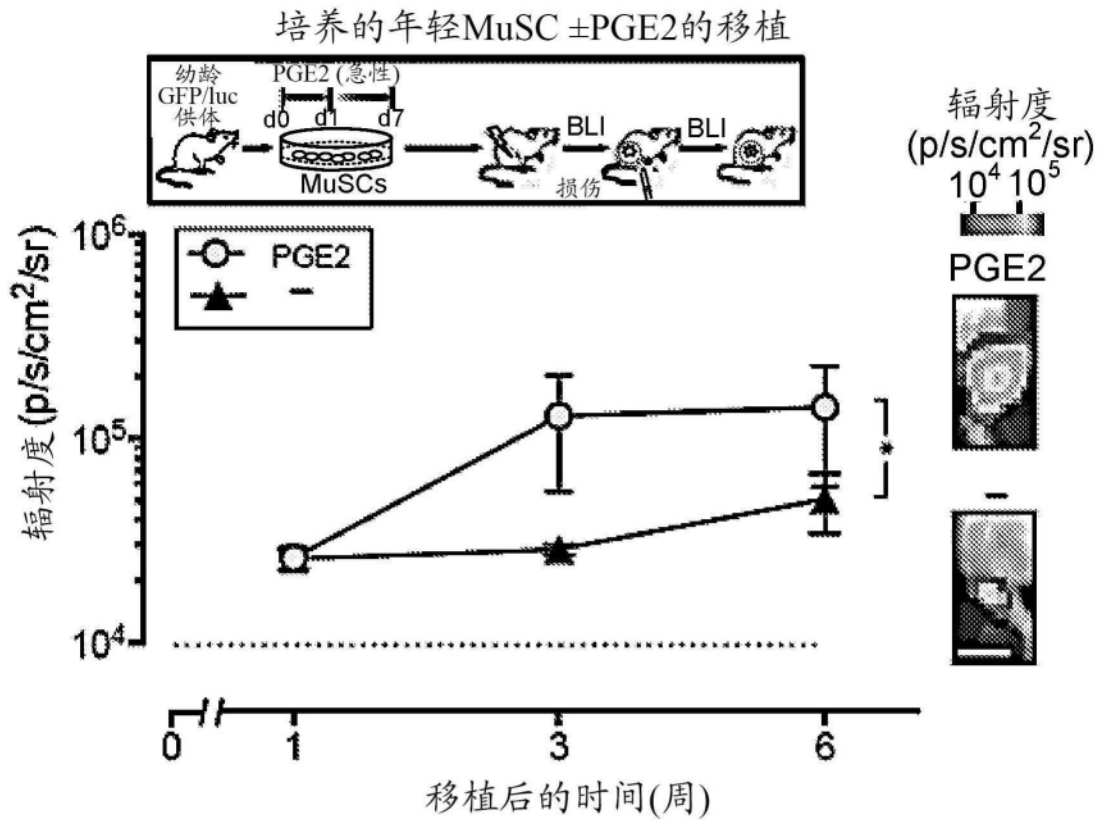


图3A

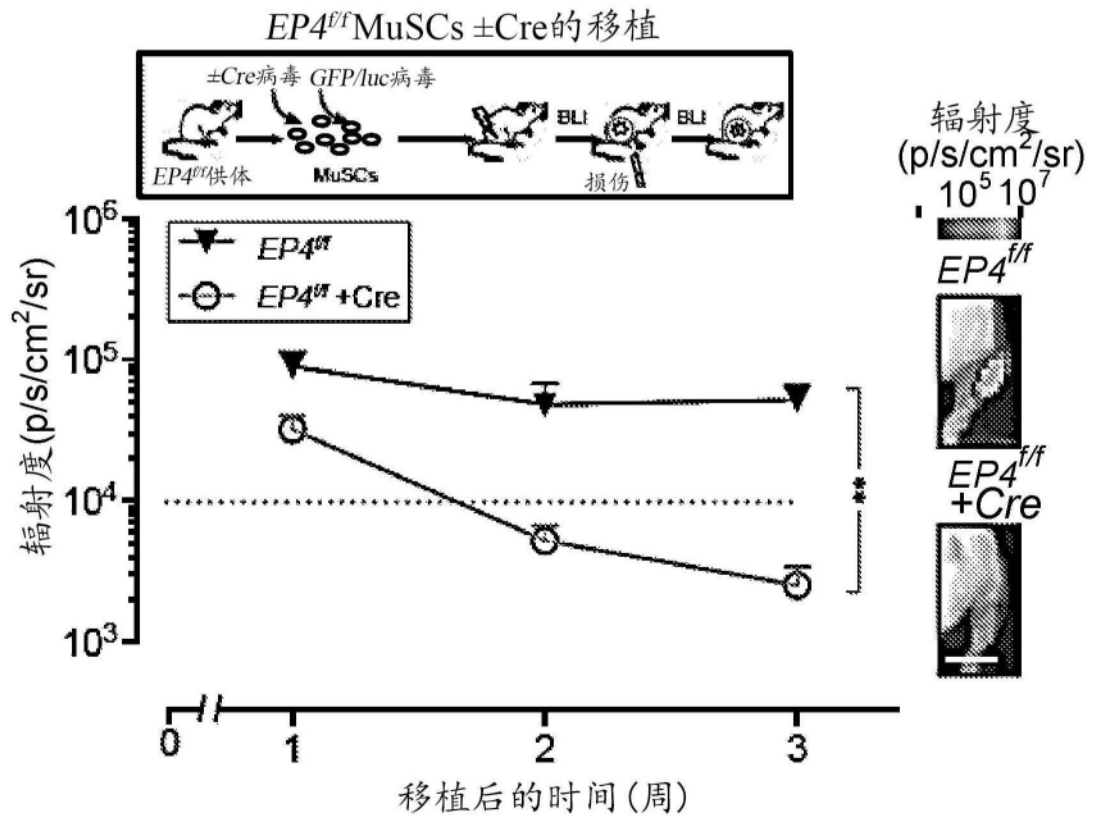


图3B

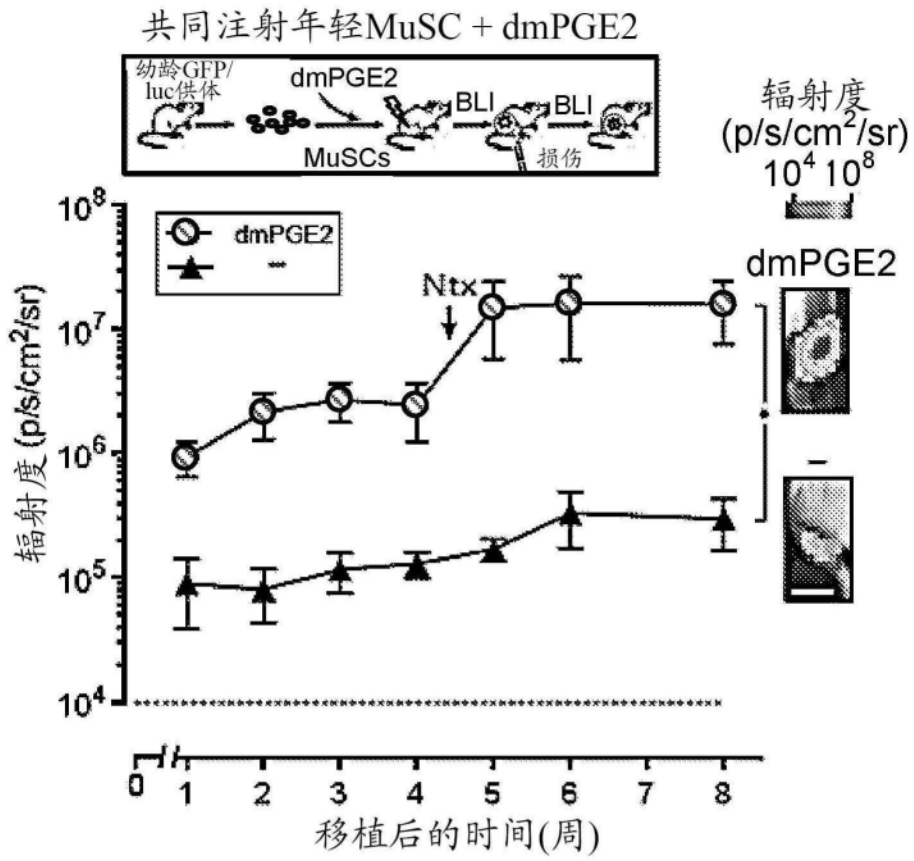


图3C

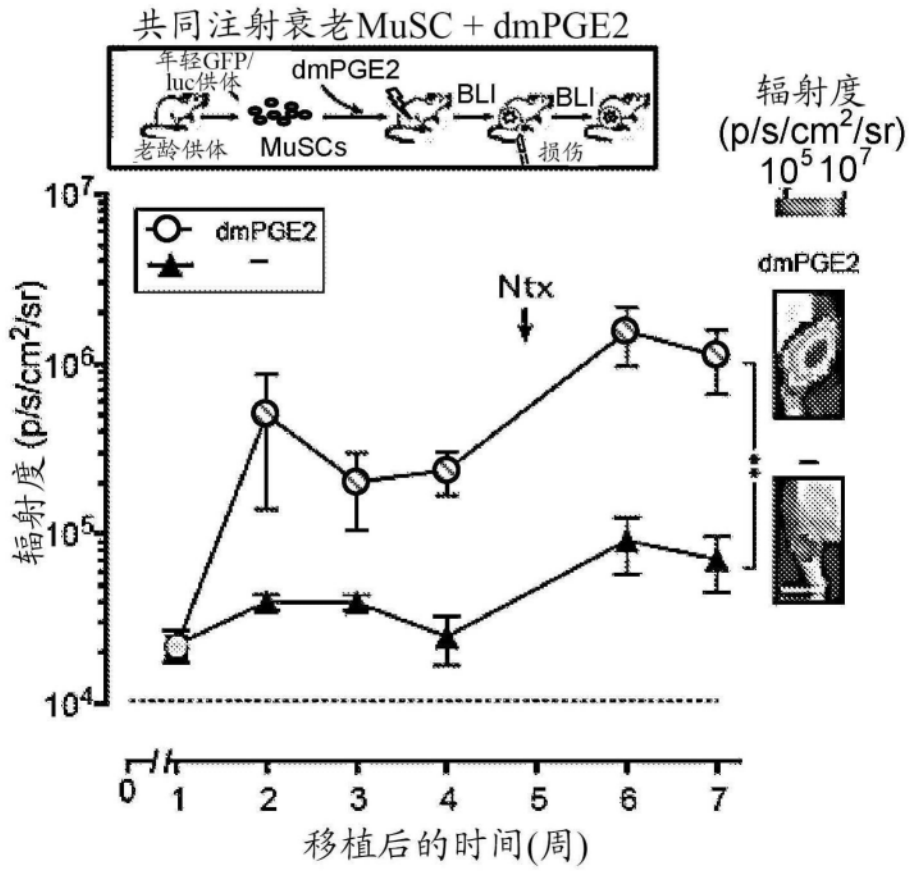


图3D

仅注射dmPGE2 (幼龄小鼠)

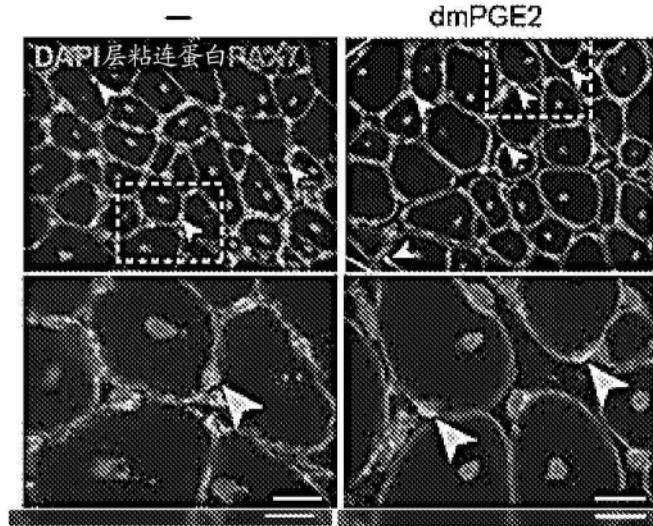
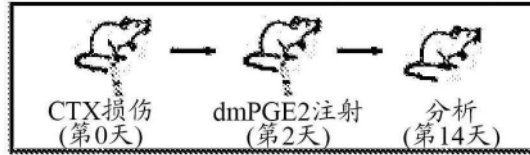


图4A

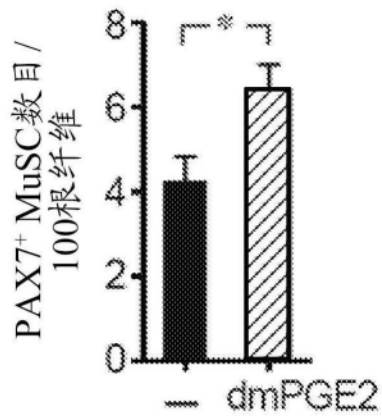


图4B

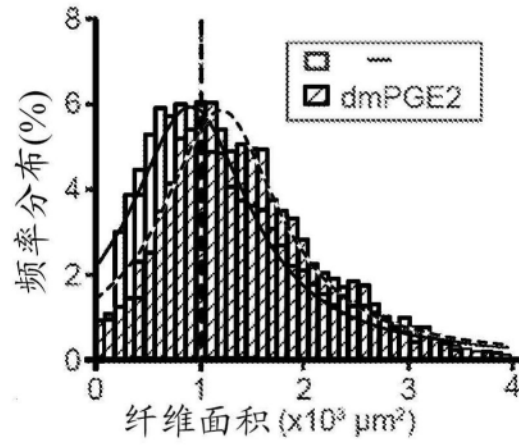


图4C

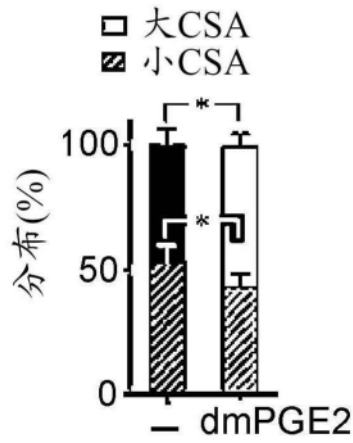


图4D

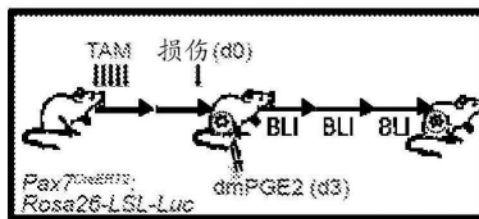


图4E

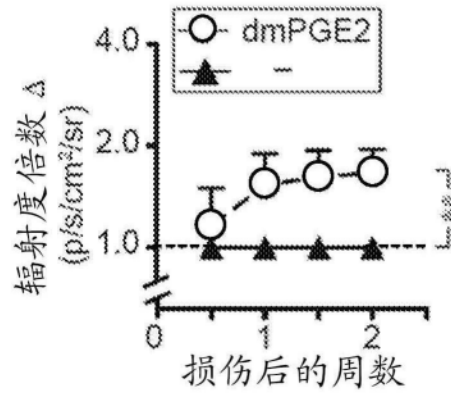


图4F

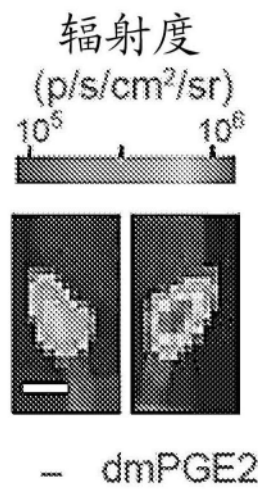


图4G

仅注射dmPGE2 (老龄小鼠)

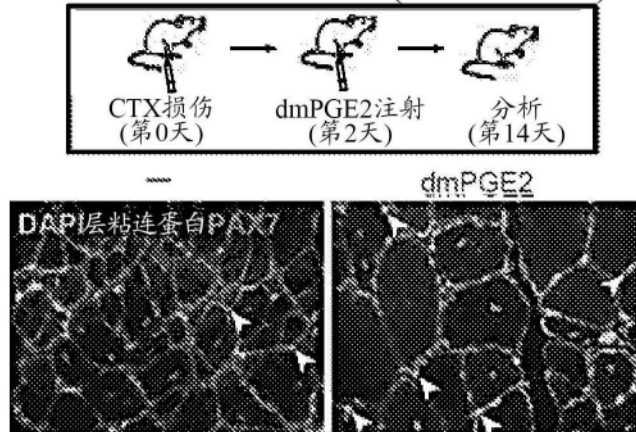


图4H

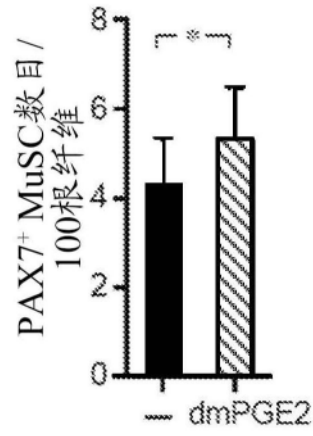


图4I

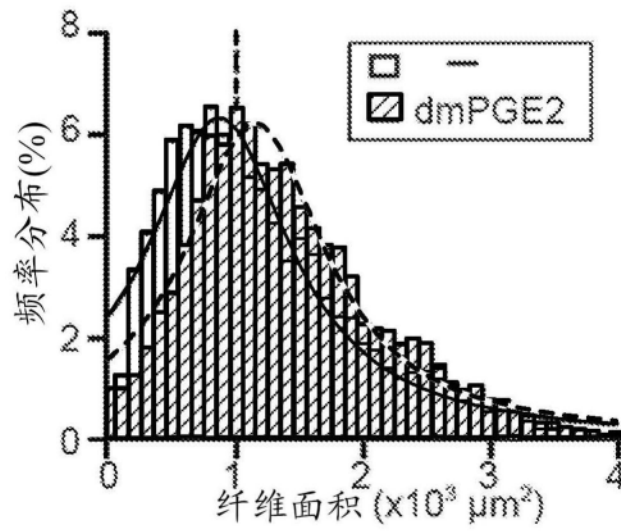


图4J

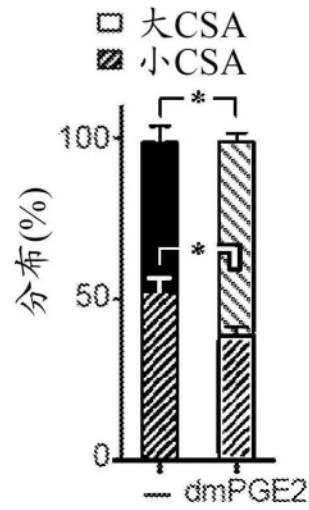


图4K

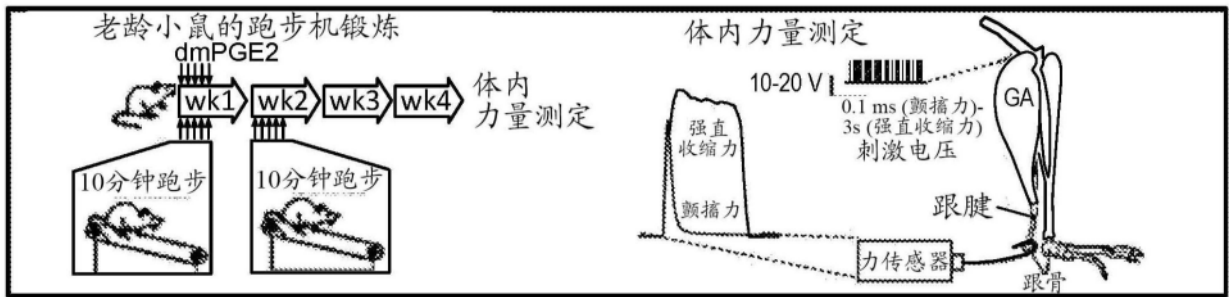


图4L

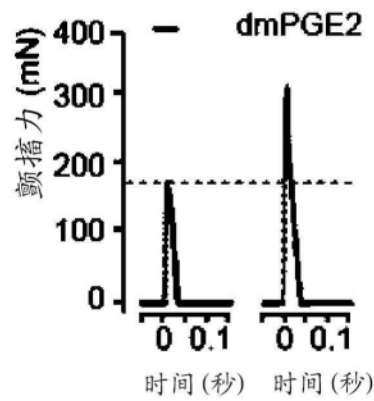


图4M

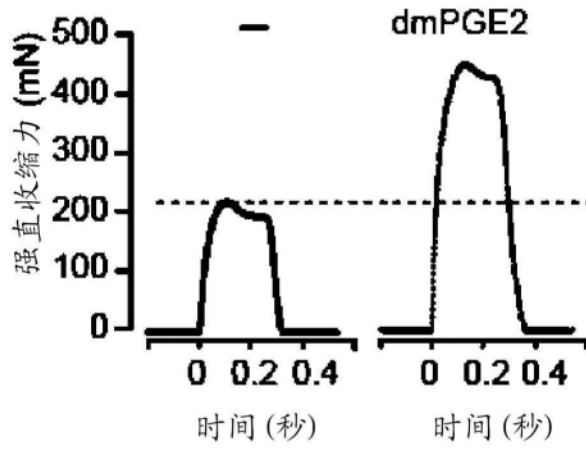


图4N

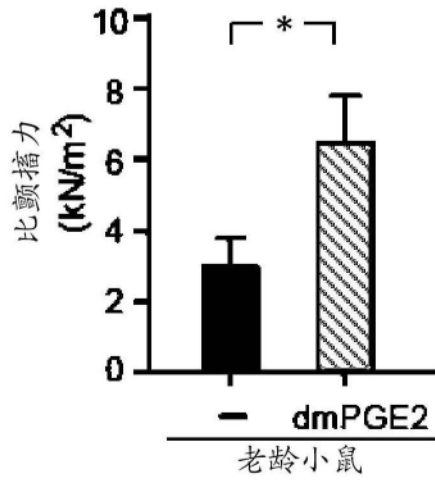


图4O

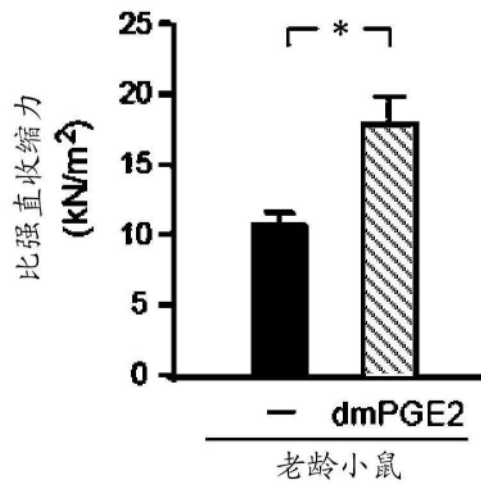


图4P

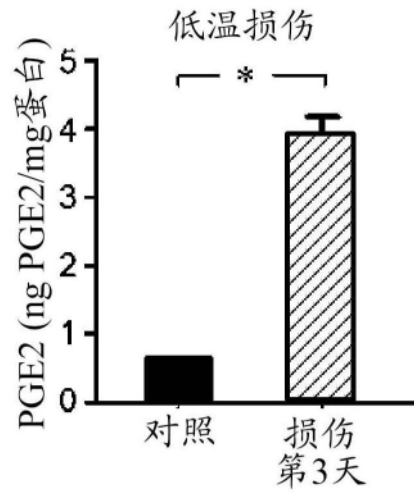


图5A

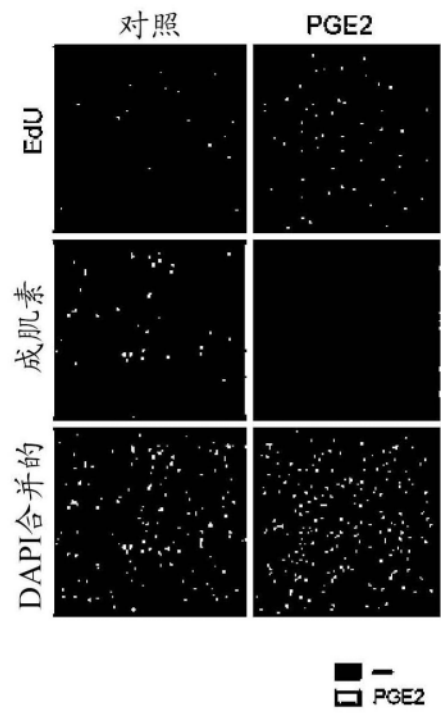


图5B

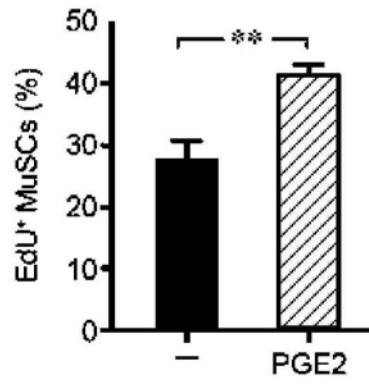


图5C

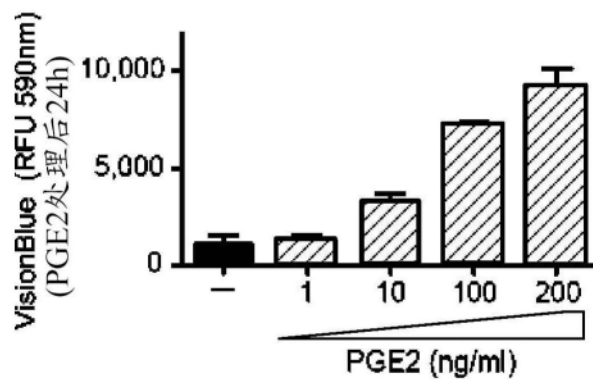


图5D

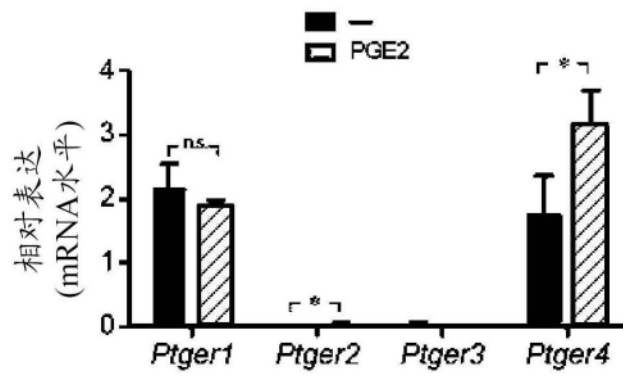


图5E

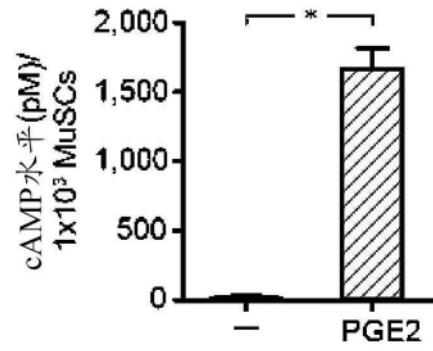


图5F

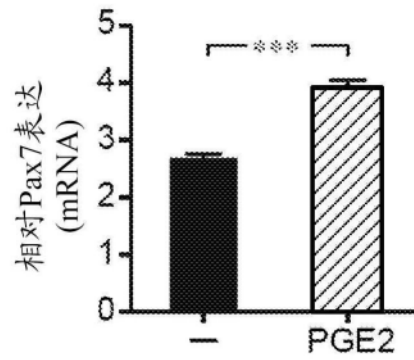


图5G

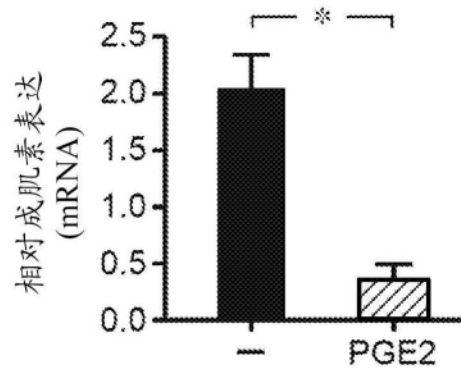


图5H

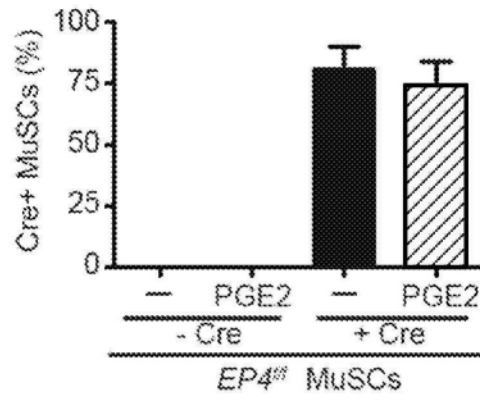


图5I

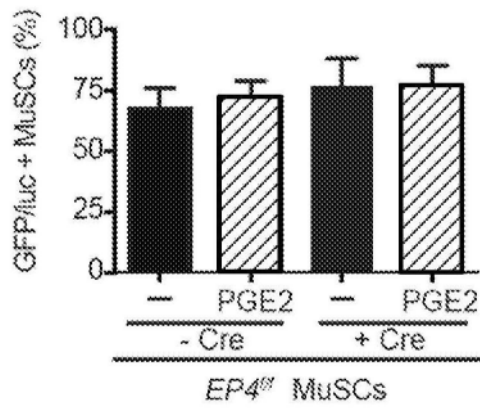


图5J

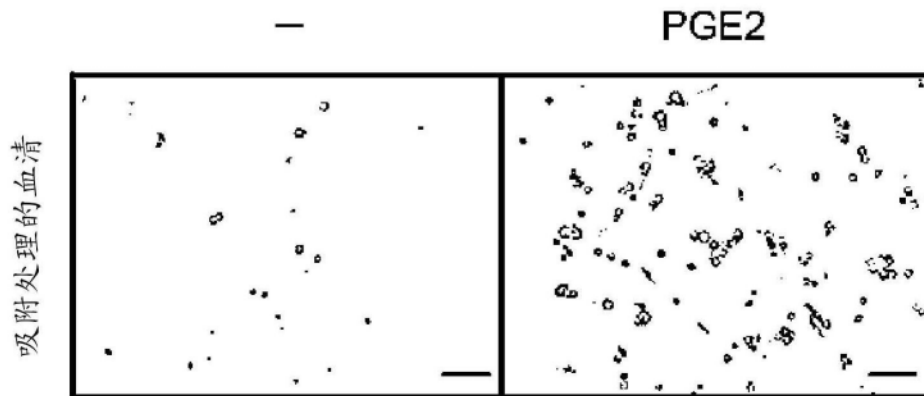


图5K

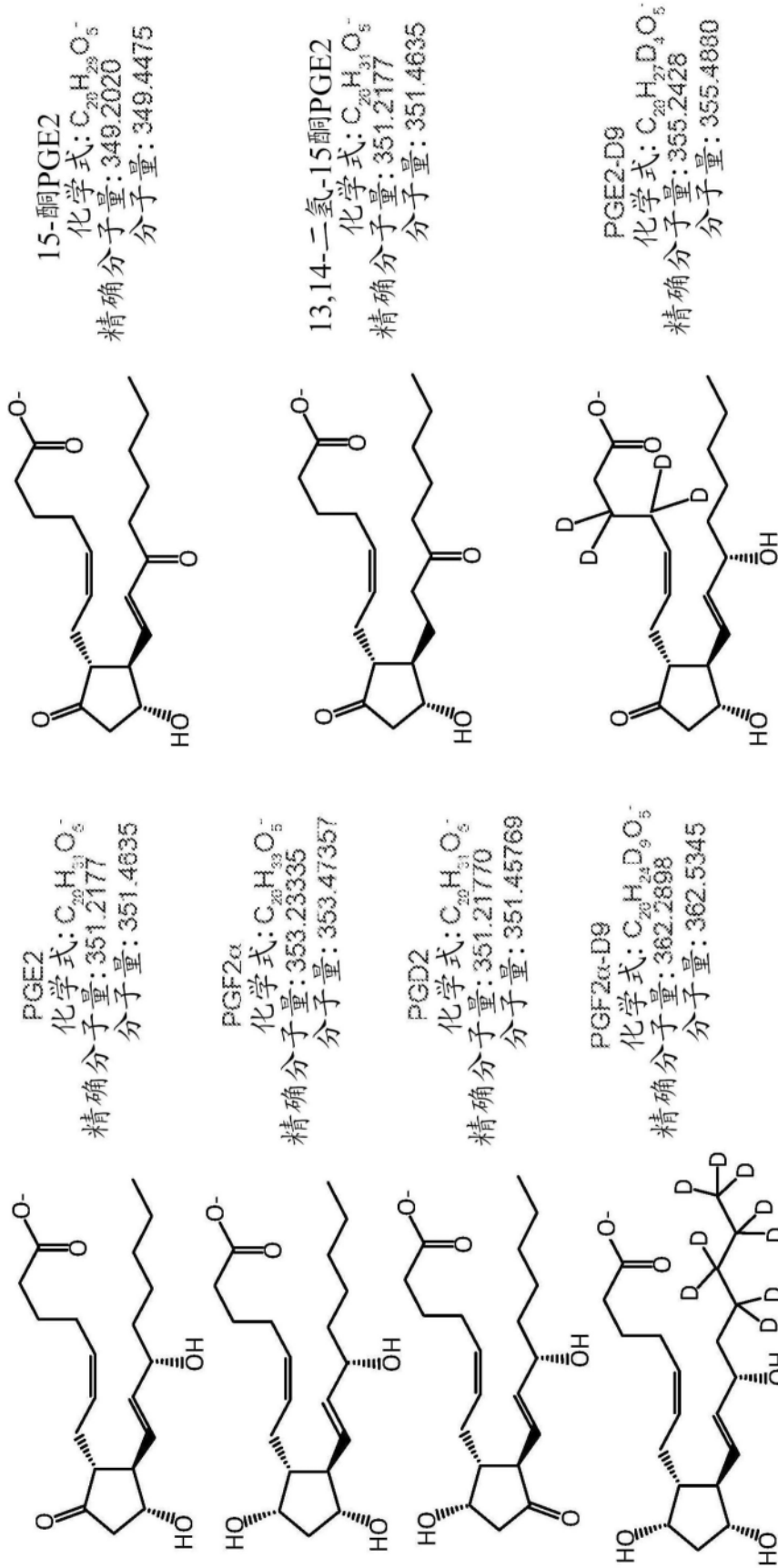


图6A

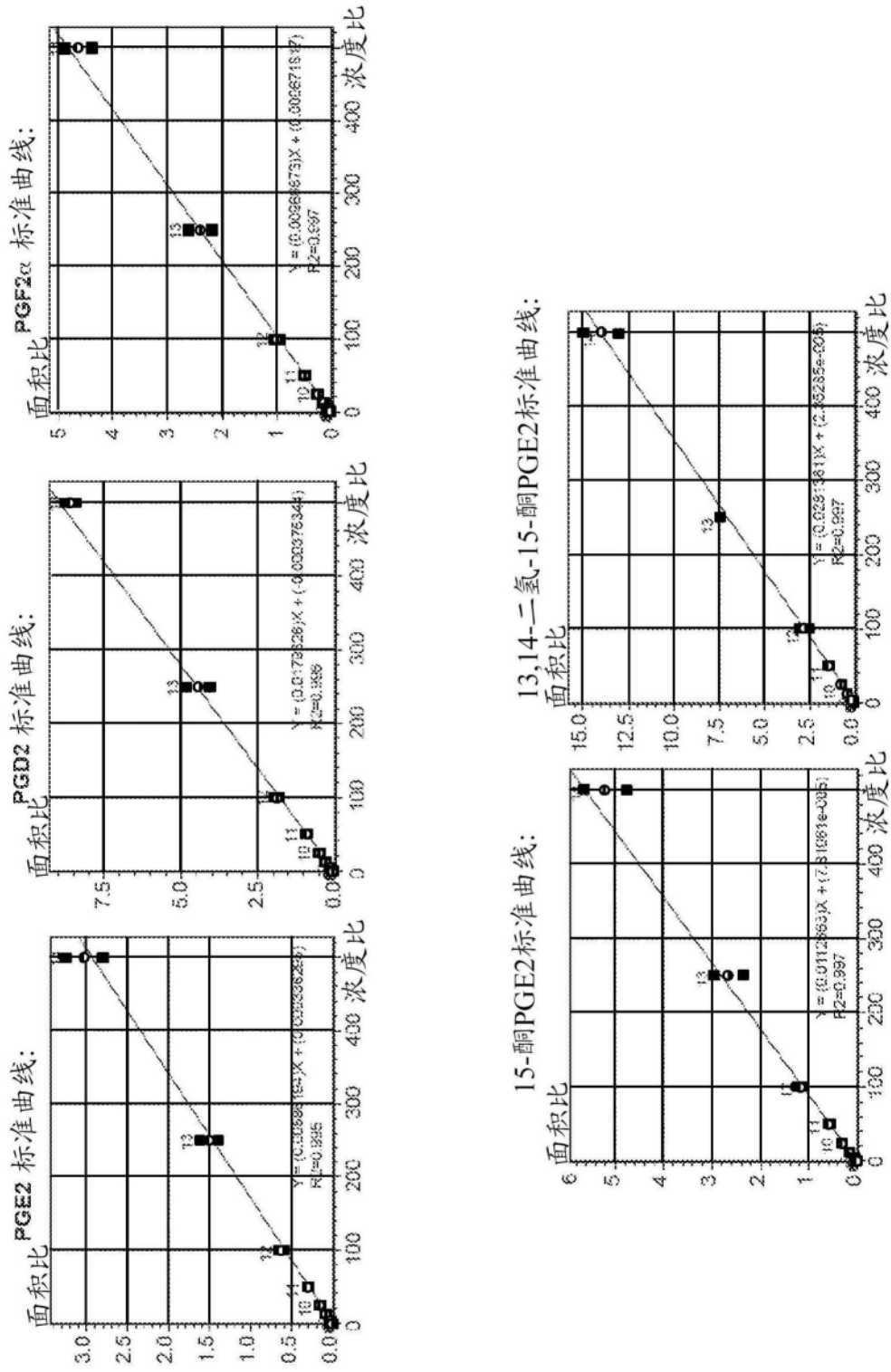


图6B

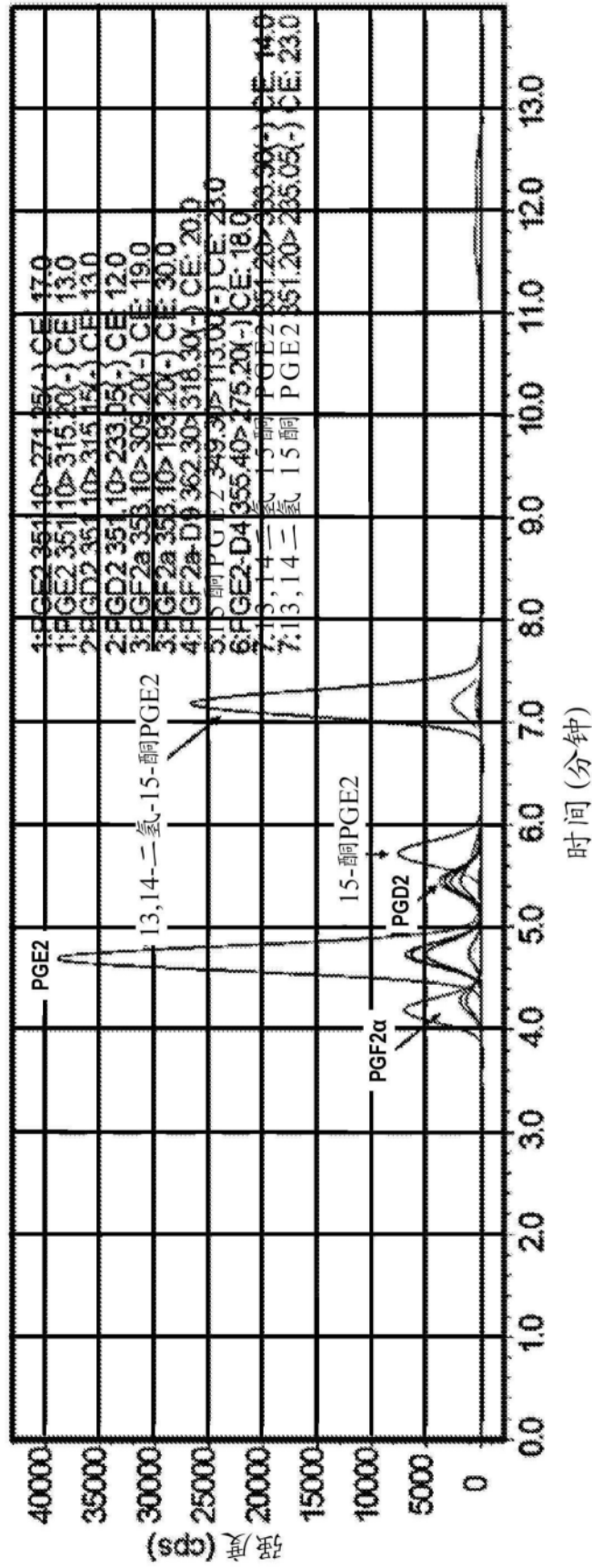


图6C

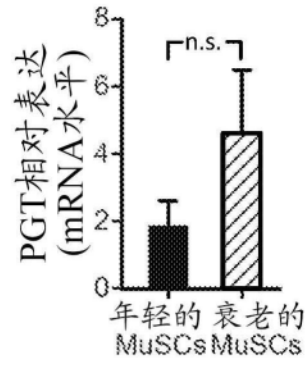


图7A

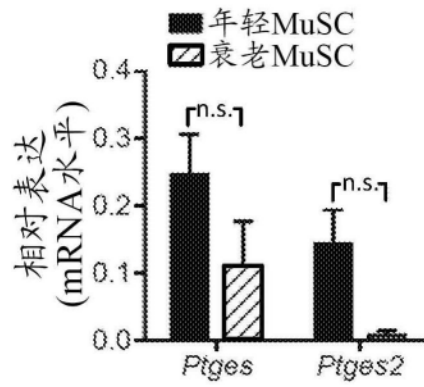


图7B

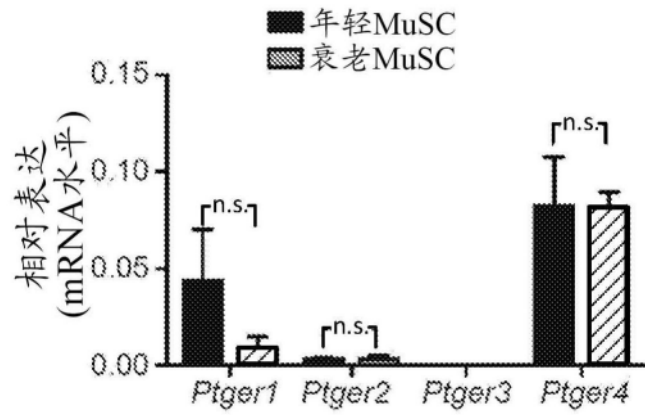


图7C

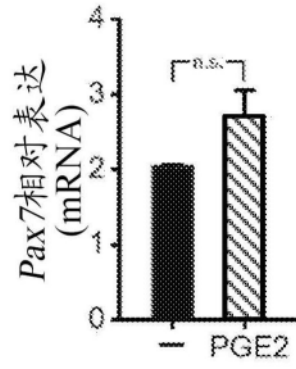


图7D

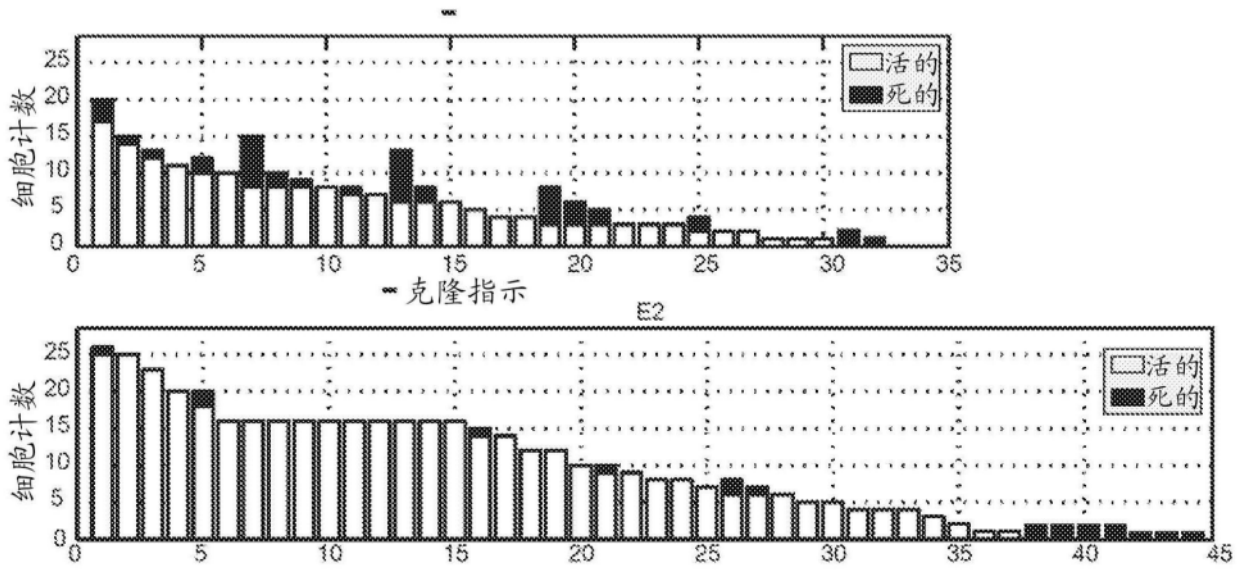


图7E

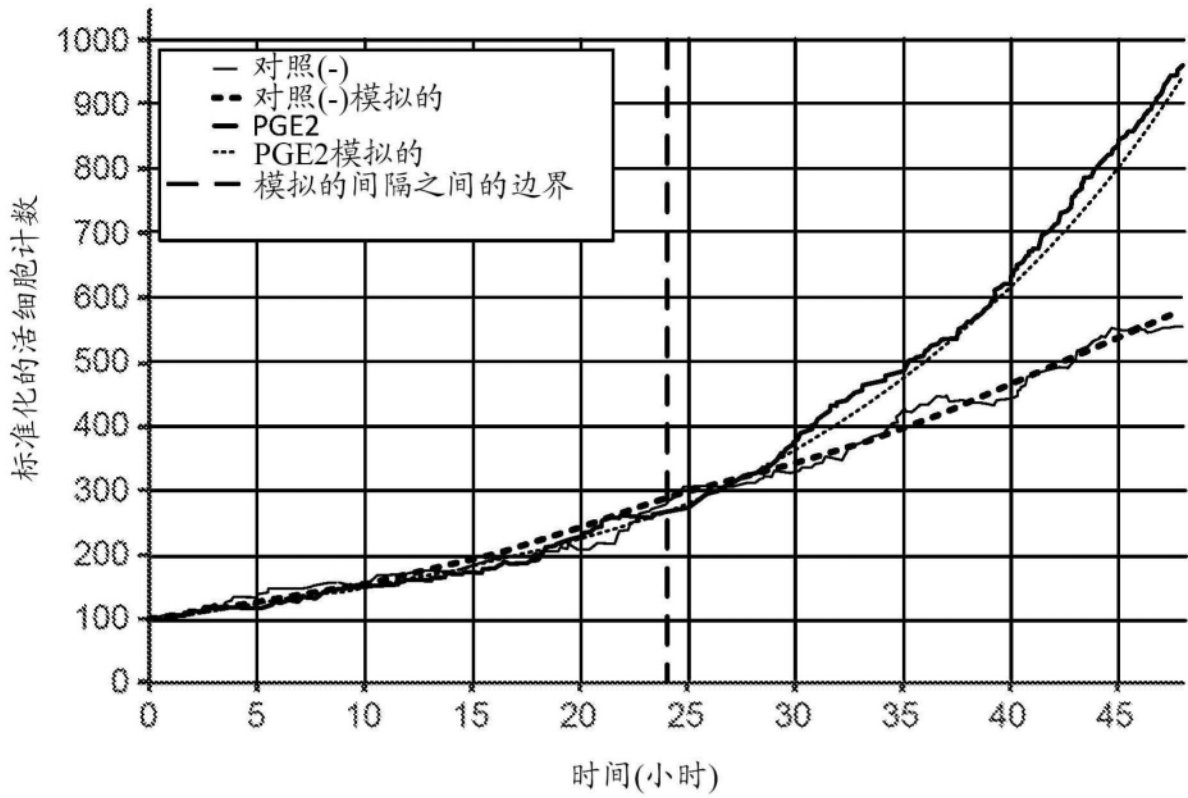


图7F

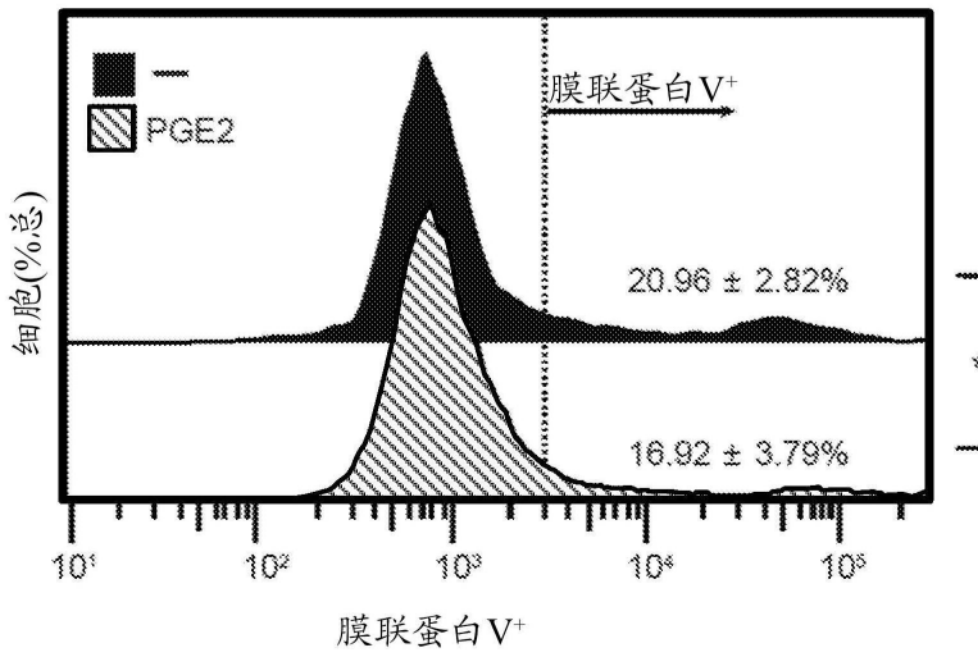


图7G

TA横截面中肌纤维的免疫荧光染色

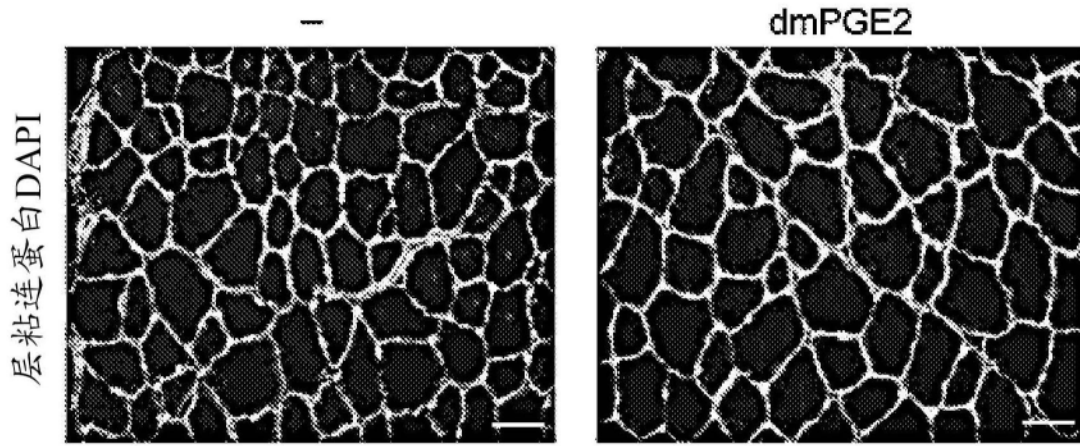


图8A

肌纤维分割以用于定量横截面面积(CSA)

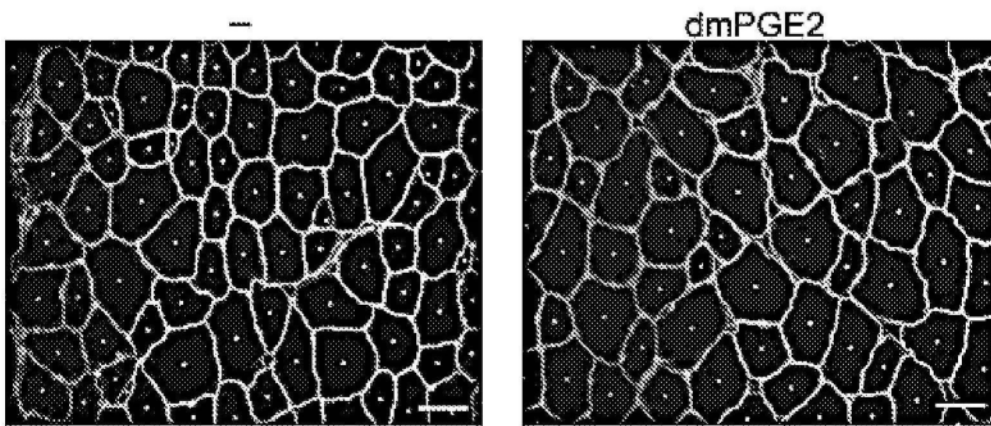


图8B

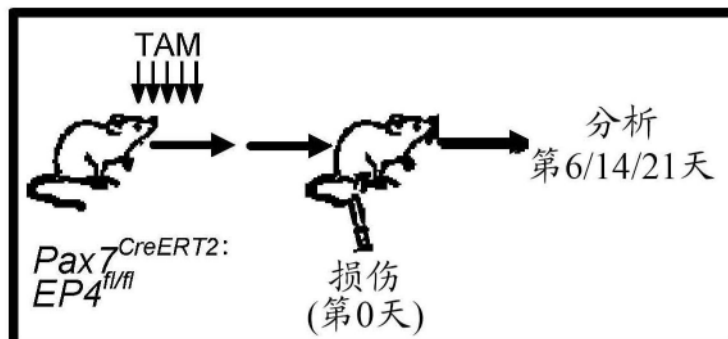


图9A

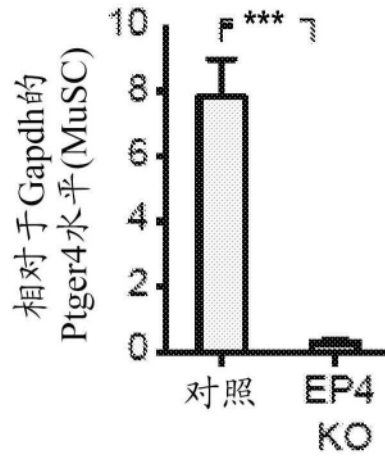


图9B

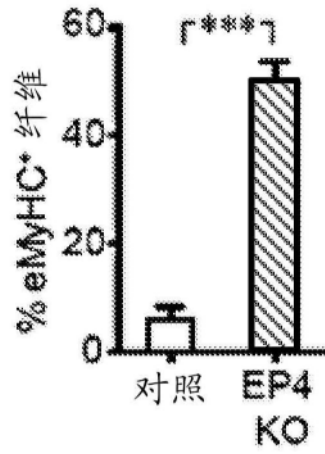


图9C

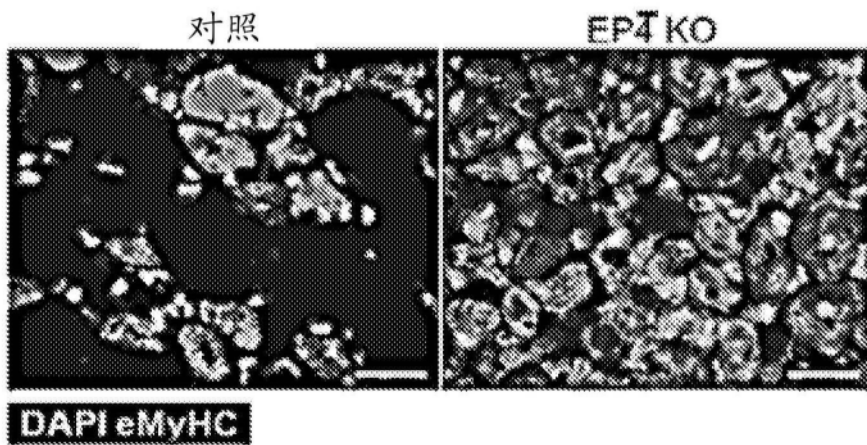


图9D

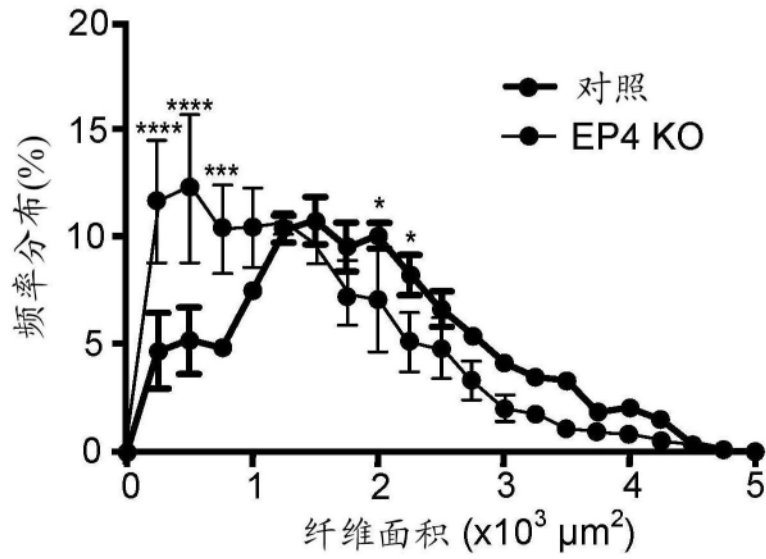


图9E

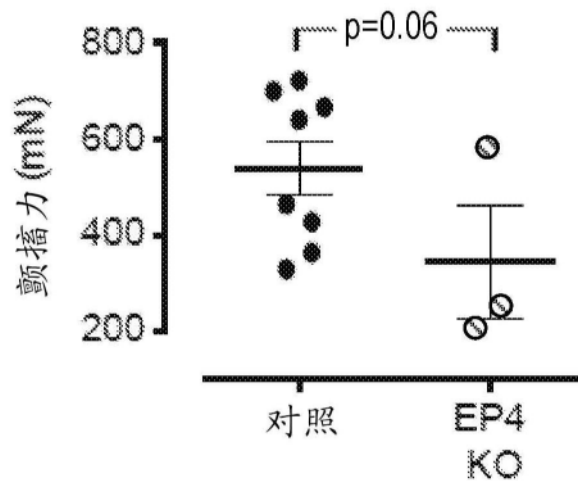


图9F

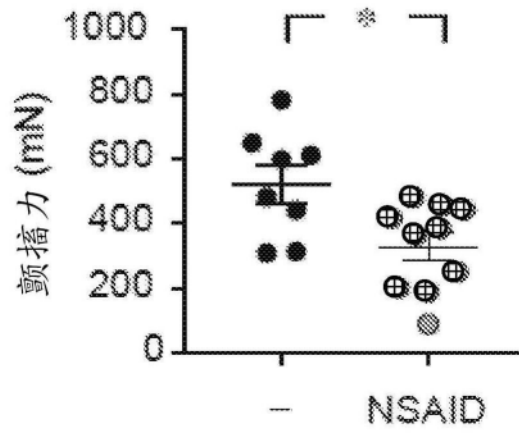


图10C