



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02816344.3

[43] 公开日 2004年11月10日

[11] 公开号 CN 1545548A

[22] 申请日 2002.6.21 [21] 申请号 02816344.3

[30] 优先权

[32] 2001.6.21 [33] US [31] 60/300,289

[32] 2001.11.29 [33] US [31] 60/334,340

[32] 2001.12.7 [33] US [31] 60/337,974

[86] 国际申请 PCT/US2002/019687 2002.6.21

[87] 国际公布 WO2003/000114 英 2003.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.20

[71] 申请人 贝思·伊斯雷尔·迪科尼斯医药中心

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 耶鲁大学 珍妮·戈斯

[72] 发明人 弗里茨·H·巴赫

埃达·M·托拜厄希

米格尔·C·索勒斯

利奥·E·奥特拜因 珍妮·戈斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书9页 说明书47页 附图12页

[54] 发明名称 一氧化碳改善组织和器官移植结局  
并抑制细胞凋亡

[57] 摘要

本发明以移植器官，组织和单一细胞的方法为特征。也以体外维持细胞和增强移植后细胞存活和/或功能的方法为特征。所述方法包括给予一氧化碳，且一氧化碳的量足以增强细胞存活和/或功能。

1. 移植器官的方法，该方法包括：
  - (a) 给予供体包含一氧化碳的药用组合物；
  - 5 (b) 从供体获得器官，其选自：肾脏，肝脏，心脏，皮肤，小肠或胰腺；  
和
  - (c) 将所述器官移植给受体，其中给予供体一氧化碳的量足以增强移植给受体后器官的存活或功能。
2. 权利要求1的方法，其中将药用组合物给予活的供体。
- 10 3. 权利要求1的方法，其中将药用组合物给予脑死亡供体。
4. 权利要求1的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在脑死亡之前和之后给予供体。
5. 权利要求1的方法，其中所述药用组合物是第一药用组合物，并且进一步包括在供体内用包含一氧化碳的第二药用组合物原位处理所述器  
15 官。
6. 权利要求1的方法，进一步包括用包含一氧化碳的第二药用组合物在移植步骤前在活体外处理所述器官。
7. 权利要求1的方法，其中所述药用组合物是第一药用组合物，并且进一步包括在步骤(c)之前，之中，或之后给予受体包含一氧化碳的第二药用组合物的步骤。  
20
8. 权利要求7的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之前给予受体。
9. 权利要求7的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(c)之中给予受体。
10. 权利要求7的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(c)  
25 之后给予受体。
11. 权利要求7的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(c)之前和之中给予受体。
12. 权利要求7的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(c)之前和之后给予受体。
- 30 13. 权利要求7的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(c)之前，之中和之后给予受体。

14. 权利要求 1 的方法，其中器官是肝脏。
15. 权利要求 1 的方法，其中器官是肾脏。
16. 权利要求 1 的方法，其中器官是心脏。
17. 权利要求 1 的方法，其中器官是胰腺。
- 5 18. 权利要求 1 的方法，其中器官是小肠。
19. 权利要求 1 的方法，其中器官是皮肤。
20. 权利要求 1 的方法，其中供体是不同于受体种属的。
21. 权利要求 1 的方法，其中供体和受体是相同种属的。
22. 权利要求 1 的方法，其中供体和受体都是非人类动物。
- 10 23. 权利要求 1 的方法，其中供体和受体都是人类。
24. 权利要求 1 的方法，其中供体是非人类动物，受体是人类。
25. 移植器官的方法，该方法包括：
- (a) 提供供体的器官；
- (b) 向所述器官给予包含一氧化碳的药用组合物；和
- 15 (c) 向受体移植器官，其中在步骤(b)中给予器官的一氧化碳的量足以增强移植给受体后所述器官的存活或功能。
26. 权利要求 25 的方法，其中步骤(b)通过当器官在供体内时原位灌注器官来完成。
27. 权利要求 25 的方法，其中步骤(b)在活体外完成。
- 20 28. 权利要求 27 的方法，进一步包括下列步骤：在步骤(b)之前，给予供体包含一氧化碳的第二药用组合物；和从供体取出所述器官。
29. 权利要求 28 的方法，其中将第二药用组合物给予活的供体。
30. 权利要求 28 的方法，其中将第二药用组合物给予脑死亡供体。
31. 权利要求 28 的方法，其中将第二药用组合物在脑死亡之前和之后
- 25 给予供体。
32. 权利要求 25 的方法，进一步包括在步骤(c)之前，之中，或之后给予受体包含一氧化碳的第二药用组合物的步骤。
33. 权利要求 32 的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之前给予受体。
- 30 34. 权利要求 32 的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之中给予受体。

35. 权利要求 32 的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之后给予受体。
36. 权利要求 32 的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之前和之中给予受体。
- 5 37. 权利要求 32 的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之前和之后给予受体。
38. 权利要求 32 的方法，其中将第二药用组合物在步骤(c)之前，之中和之后给予受体。
39. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是肝脏。
- 10 40. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是肾脏。
41. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是心脏。
42. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是胰腺。
43. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是肺脏。
44. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是小肠。
- 15 45. 权利要求 25 的方法，其中所述器官是皮肤。
46. 权利要求 25 的方法，其中供体是不同于受体种属的。
47. 权利要求 25 的方法，其中供体和受体是相同种属的。
48. 移植器官的方法，该方法包括：
- (a) 从供体提供器官；
- 20 (b) 将所述器官移植给受体；和
- (c)在步骤(b)之前，之中，或之后，给予受体包含一氧化碳的药用组合物，并且一氧化碳的量足以增强移植器官在受体内存活。
49. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之前给予受体。
- 25 50. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之中给予受体。
51. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之后给予受体。
52. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)
- 30 之前和之中给予受体。
53. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)

之前和之后给予受体。

54. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之前，之中，和之后给予受体。

55. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之后 1-20 天内给予受体。

56. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之后开始的 21 天期间内给予受体至少一次。

57. 权利要求 48 的方法，其中将包含一氧化碳的药用组合物在步骤(b)之后开始的 21 天期间内给予受体多次或连续给药。

10 58. 权利要求 48 的方法，其中根据判断移植的器官正在承受或将要发生慢性排斥将药用组合物给予受体。

59. 权利要求 48 的方法，其中根据判断移植的器官正在承受或将要发生急性排斥将药用组合物给予受体。

15 60. 权利要求 48 的方法，进一步包括在从供体获得器官之前，给予供体包含一氧化碳的第二药用组合物的步骤。

61. 权利要求 60 的方法，其中将第二药用组合物给予活的供体。

62. 权利要求 60 的方法，其中将第二药用组合物给予脑死亡供体。

63. 权利要求 48 的方法，进一步包括在步骤(b)之前，给予所述器官包含一氧化碳的第二药用组合物的步骤。

20 64. 权利要求 63 的方法，其中将第二药用组合物在供体内原位给予所述器官。

65. 权利要求 63 的方法，其中将第二药用组合物在活体外给予所述器官。

66. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是肝脏。

25 67. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是肾脏。

68. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是心脏。

69. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是胰腺。

70. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是肺脏。

71. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是小肠。

30 72. 权利要求 48 的方法，其中所述器官是皮肤。

73. 权利要求 48 的方法，其中供体是不同于受体种属的。

74. 权利要求 48 的方法，其中供体和受体是相同种属的。
75. 增强供体器官功能的方法，包括：
- (a) 提供边缘供体的器官；和
- (b) 将所述器官暴露于一定量的包含一氧化碳的药用组合物，该量足以
- 5 增强供体器官的功能。
76. 体外维持动物细胞的方法，该方法包括：
- (a) 提供装有包含一氧化碳气的加压气体的容器；
- (b) 提供体外分离的细胞，其中该细胞是原代细胞或干细胞；
- (c) 从容器释放加压气体，以形成包含一氧化碳气的氛围；和
- 10 (d) 在包含一氧化碳气的氛围存在下体外维持动物细胞。
77. 体外维持动物细胞的方法，该方法包括：
- (a) 提供包含至少 0.0001gCO/100g 培养基的培养基；和
- (b) 在培养基中维持分离的细胞。
78. 移植细胞的方法，该方法包括：
- 15 (a) 按照权利要求 77 的方法维持动物细胞；和
- (b) 将动物细胞移植给受体。
79. 权利要求 78 的方法，其中从不是所述受体的供体获得动物细胞。
80. 权利要求 78 的方法，其中从所述受体获得动物细胞。
81. 权利要求 78 的方法，进一步包括在移植之前，之中，或之后给予
- 20 受体一氧化碳组合物。
82. 权利要求 81 的方法，其中在移植之前给予受体一氧化碳组合物。
83. 权利要求 81 的方法，其中在移植之中给予受体一氧化碳组合物。
84. 权利要求 81 的方法，其中在移植之后给予受体一氧化碳组合物。
85. 权利要求 81 的方法，其中在移植之前和之后给予受体一氧化碳组
- 25 合物。
86. 权利要求 81 的方法，其中在移植之前，之中，和之后给予受体一  
氧化碳组合物。
87. 权利要求 78 的方法，其中从供体获得动物细胞的方法包括：
- (i) 给予供体包含一氧化碳的组合物；和
- 30 (ii) 从供体组织获得细胞。
88. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是胰岛的一部分。

89. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是肝细胞。
90. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是胰腺  $\beta$ -细胞。
91. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是成纤维细胞。
92. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是骨髓细胞。
- 5 93. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是神经细胞。
94. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是肌细胞。
95. 权利要求 76 的方法，其中动物细胞是干细胞。
96. 增强从供体取出后动物细胞存活的方法，该方法包括：
- 10 (a) 给予活的或脑死亡供体包含一氧化碳的药用组合物；和
- (b) 从供体获得分离的细胞，其中给予供体一氧化碳的量足以增强从供体取出后所述细胞的存活。
97. 权利要求 96 的方法，其中药用组合物是加压的气体。
98. 权利要求 96 的方法，进一步包括：(c) 在包含一氧化碳的第二药用组合物存在情况下体外维持细胞。
- 15 99. 权利要求 98 的方法，其中将(c)的细胞在液体培养基中处理。
100. 权利要求 99 的方法，其中步骤(c)的进行通过提供加压的一氧化碳气体源和将液体培养基与从加压的一氧化碳气体源释放的一氧化碳气接触。
- 20 101. 权利要求 99 的方法，其中液体培养基包含一氧化碳。
102. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是胰岛的一部分。
103. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是肝细胞。
104. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是胰腺  $\beta$ -细胞。
105. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是成纤维细胞。
106. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是骨髓细胞。
- 25 107. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是神经细胞。
108. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是肌细胞。
109. 权利要求 96 的方法，其中动物细胞是干细胞。
110. 移植动物细胞的方法，该方法包括：
- 30 (a) 给予活的或脑死亡供体包含一氧化碳的药用组合物；
- (b) 从供体获得分离的细胞；和
- (c) 将细胞移植给受体，其中给予供体的一氧化碳的量足以增强从供体

- 取出后细胞的存活。
111. 权利要求 110 的方法，其中所述供体不是所述受体。
112. 权利要求 110 的方法，其中所述供体和所述受体是相同的动物。
113. 权利要求 110 的方法，进一步包括给予受体包含一氧化碳的第二
- 5 药用组合物的步骤。
114. 权利要求 113 的方法，其中在移植步骤之前给予受体第二药用组合物。
115. 权利要求 113 的方法，其中在移植步骤之中给予受体第二药用组合物。
- 10 116. 权利要求 113 的方法，其中在移植步骤之后给予受体第二药用组合物。
117. 权利要求 113 的方法，其中在移植步骤之前和之后给予受体第二药用组合物。
118. 权利要求 113 的方法，其中在移植步骤之前，之中，和之后给予
- 15 受体第二药用组合物。
119. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是胰岛的一部分。
120. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是肝细胞。
121. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是胰腺 $\beta$ -细胞。
122. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是成纤维细胞。
- 20 123. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是骨髓细胞。
124. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是神经细胞。
125. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是肌细胞。
126. 权利要求 110 的方法，其中动物细胞是干细胞。
127. 增强移植给受体的动物细胞存活或功能的方法，该方法包括：
- 25 (a) 将动物细胞移植给受体；和
- (b) 在移植步骤之前，之中，或之后，使该受体吸入一定量的一氧化碳气，该量足以增强受体内移植的细胞的存活或功能。
128. 权利要求 127 的方法，其中以含有包含一氧化碳的加压气体的容器的形式供应一氧化碳气。
- 30 129. 权利要求 127 的方法，进一步包括在移植步骤前，将所述细胞在活体外暴露于一氧化碳组合物的步骤。



130. 权利要求 127 的方法，其中在移植步骤前，将所述动物细胞维持在包含至少 0.0001gCO/100g 培养基的液体培养基中。
131. 权利要求 127 的方法，其中在移植步骤前，将所述细胞体外维持在包含一氧化碳的氛围中。
- 5 132. 权利要求 127 的方法，其中在移植步骤中给予受体一氧化碳气。
133. 权利要求 127 的方法，其中在移植步骤之后给予受体一氧化碳组合物。
134. 权利要求 127 的方法，其中在移植步骤之前给予受体一氧化碳组合物。
- 10 135. 权利要求 127 的方法，其中从不是所述受体的供体获得所述细胞。
136. 权利要求 127 的方法，其中从所述受体获得所述细胞。
137. 权利要求 127 的方法，其中在移植给所述受体之前从供体取出所述细胞；和
- 15 从所述供体取出所述细胞前给予所述供体包含一氧化碳的药用组合物。
138. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是胰岛的一部分。
139. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是肝细胞。
140. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是胰腺 $\beta$ -细胞。
141. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是成纤维细胞。
- 20 142. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是骨髓细胞。
143. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是神经细胞。
144. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是肌细胞。
145. 权利要求 127 的方法，其中动物细胞是干细胞。
146. 改善受体内移植细胞存活的方法，包括在将细胞移植给受体之前，
- 25 之中，或之后给予所述受体有效量的包含一氧化碳气的药用组合物，因此改善移植后所述细胞的存活。
147. 一种制备的物品，其包括一种容器和一种标签，所述容器含有包括至少 0.001ppm 一氧化碳的加压气体，所述标签描述在将细胞移植给患者之前，之中或之后使用所述气体以增强分离的动物细胞存活。
- 30 148. 一种无菌细胞培养基，其包括：(a)适合维持培养动物细胞的营养物和(b)至少约 0.0001gCO/100g 培养基。

- 
149. 体外维持动物细胞的方法，该方法包括：
- (a) 提供装有包含一氧化碳气的加压气体的容器；
  - (b) 提供体外分离的动物细胞，其中将所述细胞在包含溶解的一氧化碳的培养基中处理；
- 5      (c) 从所述容器释放加压的气体，以形成包含一氧化碳气的氛围；和
- (d) 在所述氛围存在情况下维持所述细胞；和
  - (e) 将所述细胞移植给受体。

一氧化碳改善组织和器官移植  
结局并抑制细胞凋亡

5

关于联邦资助研究的声明

本发明在政府资助的国立卫生研究院基金 Nos.HL58688 下进行。政府自然拥有本发明的一些权利。

10

技术领域

本发明涉及增强细胞存活的领域。

技术背景

高浓度的一氧化碳气体是有毒的。但是，现在它被认为是重要的信号  
15 分子(Verma et al., Science 259:381-384, 1993)。也已表明在脑内一氧化碳作为  
神经递质分子(Id.)和在下丘脑作为神经内分泌调节物(Pozzoli et al.,  
Endocrinology 735: 2314-2317,1994)。像一氧化氮(NO)一样，一氧化碳是平  
滑肌舒张剂(Utset al., Biochem Pharmacol. 47: 195-201,1991; Christodoulides  
20 et al., Circulation 97: 2306-9, 1995)并抑制血小板聚集(Mansouri et al., Thromb  
Haemost. 48: 286-8,1982)。已经发现在某些模型上吸入低水平的 CO 具有抗  
炎作用。

胰岛细胞移植是改善 I 型糖尿病的有效治疗(Lacy et al., Annu. Rev.  
Immunol., 2: 183-98,1984; Weir et al., J. Am. Optom. Assoc. 69: 727-32, 2000;  
Berney et al., Langenbechs Arch. Surg. 385: 378-8,2000; Shapiro et al., NEngl. J.  
25 Med., 343: 230-8,2000)。但是，许多因素致使临床胰岛移植困难。一个因素  
是移植物的原发性无功能(PNF)。另一个是要有成功逆转糖尿病所需的大量  
供体胰岛(Shapiro et al., N Engl.J. Med., 343: 230-8,2000)。两种状况反映出同  
样的病理生理：移植后开始的数周内移植物中实质细胞丢失。移植后，胰  
岛经历许多应激因素例如二次血管化之前的缺氧(Carlsson et al., Diabetes 47:  
30 1027-32,1998)和暴露于前炎性细胞因子和移植物微环境中巨噬细胞  
(Rabinovitch et al., Diabetes 48: 1223-9,1999; Kaufman et al., J Exp Med. 772:

291-302,1990; Corbett et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 1731-5,1993)和受体胰岛巨噬细胞(Mandrup-Poulsen et al., J. Immunol. 739: 4077-82,1987; Arnush et al., J. Clin Invest. 702: 516-26,1998)释放的自由基。免疫抑制药物的毒性作用以及排斥反应也促使胰岛细胞丢失(Weir et al., Diabetes 46: 1247-56, 5 1997)。实验性同源胰岛移植后存在 PNF(Nagata et al., Transplant Proc. 22: 855-6,1990; Arita et al., Transplantation 65: 1429-33,1998)表明非特异炎症在此事件中起主要作用。

从阻断导致移植排斥的免疫应答方面来说,认为移植器官的存活主要涉及免疫抑制的成功。但是,以前发现移植器官可以通过表达“保护基因” 10 保护自己免受导致排斥的血管损伤(见,例如 Bach et al., Nature Med. 3: 196-202 (1997); 和 Soares et al., Nature Med. 4: 1073-1077,1998)。一个这样的基因,血红素氧合酶(HO-1),将血红素代谢成胆绿素,游离铁和 CO(Tenhunen et al., Proc Natl Acad Sci USA 61: 748-755,1968)。

## 15 发明概述

本发明部分以 CO 促进器官,组织和单一细胞移植物的存活和/或功能的研究为基础。

因此,一方面,本发明提供下列方法:向移植物供体给予含有一氧化碳的药用组合物,从供体获得器官,组织或细胞,并将所述器官,组织或 20 细胞移植给受体,其中给予供体的一氧化碳的量足以增强移植后器官,组织,或细胞在受体内的存活或功能。

可以将药用组合物给予活的供体,脑死亡的供体,或脑死亡之前和之后的供体。

任意地,可以将器官在供体内原位(*in situ*)和/或在活体外(*ex vivo*)用含 25 一氧化碳的药用组合物处理。

所述方法也可以或替代地包括在将所述器官或组织移植给受体之前和/或之中和/或之后给予受体第二种含有一氧化碳的药用组合物的步骤。

在这里描述的此方法或任何方法中,器官或组织可以是能被移植的任何器官或组织,例如肝,肾,心脏,胰腺,肺,小肠,和/或皮肤,并且供体 30 可以是不同于受体的种属的,或者供体和受体是同一种属的。供体和受体可以都是非人类动物或都是人类。或者,供体可以是非人类动物例如猪,

而受体可以是人类。

在另一方面，本发明提供移植器官，组织或细胞的方法，该方法包括提供供体的器官，组织或细胞，在活体外或原位向器官，组织或细胞给予包含一氧化碳的药用组合物，和将器官，组织，或细胞移植给受体，其中  
5 一氧化碳的量足够增强器官，组织，或细胞在受体内存活或功能。在一个实施方案中，当器官或组织在供体内时通过原位灌注器官或组织将药用组合物给药。

或者，所述方法可以包括在向受体移植器官或组织之前和/或之中和/或之后给予受体第二种含有一氧化碳的药用组合物的步骤。

10 另一方面，本发明提供移植器官，组织或细胞的方法，其包括下列步骤：提供供体的器官，组织或细胞，将所述器官，组织，或细胞移植给受体，和在将器官，组织或细胞移植给受体之前和/或之中和/或之后给予受体一定量的药用组合物，其含有足够增强移植的器官，组织，或细胞在受体内存活和/或功能的一氧化碳。

15 在一个实施方案中，可以将所述药用组合物在将器官移植给受体后 0 - 20 天内向受体给药，例如在 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 或 20 天内。在另一实施方案中，从向受体移植器官或组织步骤后开始的 21 天，至少向受体给予一次药用组合物，例如，多次或连续给予，只要保证移植存活的需要。当判断移植的器官或组织正发生或将要发生排斥反应例如慢  
20 性排斥反应或急性排斥反应时可以向受体给予药用组合物。

任意地，所述方法可以进一步包括在从供体获取器官，组织或细胞前向供体给予含有一氧化碳的第二药用组合物的步骤。可以将第二药用组合物给予活的供体或脑死亡的供体。

25 所述方法可以包括在供体内原位和/或在活体外向所述器官给予含有一氧化碳的第二药用组合物的步骤。

另一方面，本发明提供增强供体器官，组织或细胞存活和/或功能的方法，其包括提供边缘供体的器官，组织或细胞和将所述器官，组织或细胞暴露于一定量的药用组合物，该组合物含有足够增强供体器官，组织或细胞存活和/或功能的一氧化碳。

30 另一方面，本发明提供体外维持动物细胞的方法，其包括提供装有包含一氧化碳气的加压(pressurized)气体的容器，提供体外分离的细胞，其中

该细胞是原代细胞或干细胞，从容器中释放加压气体以形成含有一氧化碳气的氛围(atmosphere)，和在含有一氧化碳气的气体存在的条件下维持体外动物细胞。

如需要，可以将所述细胞移植给受体。可以从非所述受体的供体获得5 细胞，或者可以从所述受体获得细胞。进一步，可以在移植步骤之前，和/或之中，和/或之后给予一氧化碳组合物。这种组合物一般是吸入气的形式。

在另一实施方案中，从供体获得动物细胞，其使用的方法包括给予供体含有一氧化碳的组合物并从所述供体组织获得细胞。

本发明也提供体外维持动物细胞的方法，其包括提供含有有效量一氧10 化碳的培养基，例如，至少 0.0001gCO/100g 培养基，并在培养基中维持分离的细胞。该培养基可以含有，例如，至少 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0008, 0.0010, 0.0013, 0.0014, 0.0015, 0.0016, 0.0018, 0.0020, 0.0021, 0.0022, 0.0024, 0.0026, 0.0028, 0.0030, 0.0032, 0.0035, 0.0037, 0.0040, 0.0042, 或 0.0044 gCO/100g 培养基。

15 而且，本发明提供增强从供体取出后的动物细胞存活的方法，其包括给予活的或脑死亡供体含一氧化碳的药用组合物，并从该供体获得分离的细胞。所述药用组合物可以例如以适合被供体吸入的加压气体形式供给。

所述方法可以进一步包括在存在第二个含有一氧化碳的组合物存在时体外维持细胞的步骤。

20 可以在液体培养基中体外处理细胞。此情况下，将细胞暴露于第二个一氧化碳组合物的步骤可以通过提供加压的一氧化碳气体源并将液体培养基与从气源释放的一氧化碳气接触来进行。也可以将液体培养基本身以一氧化碳组合物提供，即一氧化碳溶解于其中。

25 而且，本发明提供移植动物细胞的方法，其包括给予活的或脑死亡供体含一氧化碳的药用组合物，从该供体获得分离的细胞和将该细胞移植给受体。可以从非所述受体的供体获得动物细胞，或者可以从所述受体获得细胞。如需要，可以在移植步骤之前，和/或之中，和/或之后给予所述受体一氧化碳组合物。

30 本发明也提供增强移植入受体内动物细胞存活或功能的方法，其包括下列步骤：将动物细胞移植给受体和在移植步骤之前，之中，和/或之后让所述受体吸入一定量的足够增强移植的细胞在受体内存活或功能的一氧化

碳气。可以以装有包含一氧化碳气的加压气体的容器形式提供一氧化碳气。在一实施方案中，移植步骤前在含有一氧化碳的氛围中体外维持细胞。例如，可以将动物细胞维持在液体培养基中，该培养基至少含有至少  
5 0.0001gCO/100g 培养基(例如，至少约 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0008, 0.0010, 0.0013, 0.0014, 0.0015, 0.0016, 0.0018, 0.0020, 0.0021, 0.0022, 0.0024, 0.0026, 0.0028, 0.0030, 0.0032, 0.0035, 0.0037, 0.0040, 0.0042, 或 0.0044 gCO/100g 培养基)。

本发明可选择性的包括在移植步骤前，将细胞在活体外暴露于一氧化碳组合物的步骤。

10 可以在移植步骤之前，和/或之中，和/或之后给予受体一氧化碳气。可以从非受体的供体获得动物细胞，或者可以从受体获得细胞。可以在从供体取出细胞之前和/或之中给予供体含一氧化碳的药用组合物。

在另一方面，本发明提供改善受体内移植的细胞存活的方法，其包括在将细胞移植给受体之前和/或之中和/或之后给予受体有效量的含有一氧化碳气的药用组合物。  
15

在任何本发明的上述方法中，诱导供体内或受体内血红素氧合酶(HO-1)可以增强存活效应，例如，用血红素，重金属，细胞因子，激素，一氧化氮，内毒素，UV 辐射，或谷胱甘肽消耗剂(depletors); 或通过热休克诱导。在供体内，这种诱导可以在取出器官，组织或细胞之前或之中进行。在受  
20 体内，这种诱导可以在移植之前或之中或之后进行。或者，可以在移植给受体之前在活体外在器官，组织，或细胞内诱导所述酶。

本发明进一步提供制备的物品，其包括含有加压气体的容器和标签，容器含有至少 0.001ppm，例如，至少约 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 2000, 5000, 10,000, 100,000, 200,000, 300,000, 400,000, 25 500,000, 和高达 1,000,000ppm 的一氧化碳，标签描述在将细胞，组织，或胰岛移植给患者之前，之中或之后使用气体以增强分离的动物细胞，组织或胰岛的存活。

无菌细胞培养基也包括在本发明中，其包括适于维持培养中动物细胞的营养物和至少约 0.0001gCO/100g 培养基，例如，至少约 0.0002, 0.0004, 30 0.0006, 0.0008, 0.0010, 0.0013, 0.0014, 0.0015, 0.0016, 0.0018, 0.0020, 0.0021, 0.0022, 0.0024, 0.0026, 0.0028, 0.0030, 0.0032, 0.0035, 0.0037,

0.0040, 0.0042, 或 0.0044 gCO/100g 培养基。它也可以包含动物细胞。

本发明也提供体外维持动物细胞和之后进行移植的方法。该方法包括以下步骤：提供含一氧化碳气的加压气体的容器；提供体外分离的动物细胞，其中将细胞在含有溶解的一氧化碳的培养基中处理；从容器释放加压  
5 气体以形成含有一氧化碳气的氛围；在该氛围下维持细胞；和将该细胞移植给受体。

在任何上述方面或本发明的实施方案中，所述细胞可以是任何细胞。例如，所述细胞可以是动物细胞诸如原代，第二代，或细胞系的细胞。另一例子如，所述细胞可以是部分胰岛，例如  $\beta$ -细胞。所述细胞也可以是，  
10 例如，肝细胞，成纤维细胞，骨髓细胞，神经细胞，肌细胞，淋巴细胞，或干细胞。在本发明的每个在活体外方法中，所述组织优选不是血液和含有极少量全血，所述细胞优选不是红细胞和不伴有明显数量的红细胞。

除非另有说明，这里使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域任何普通技术人员所一般理解的同样意义。尽管在实践中或验证本发明  
15 时可以使用与这里描述的相似或相当的方法和材料，合适的方法和材料如下面描述。这里提到的所有出版物，专利申请，专利，和其他参考文献以其全部引入作参考。如有矛盾，以包括定义的本说明书为准。材料，方法，和实施例仅作参考，不用以限制本发明。

本发明的其他特点和优势将从下面的详细描述和权利要求书中阐明。

20

#### 附图说明

图 1A 是直方图，其描述用递增浓度的 TNF- $\alpha$ 处理 $\beta$ TC3 细胞的作用。

图 1B 图形描述用 TNF- $\alpha$ 处理后 $\beta$ -TC3 细胞的 DNA 片段的 FACScan<sup>TM</sup>分析。

25 图 1C 是直方图，其描述用 $\beta$ -半乳糖表达载体(pcDNA3/ $\beta$ -gal)和对照(pcDNA3)共转染 $\beta$ TC3 的作用，并且用半胱天冬蛋白酶(caspase)-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK(C3-i)或半胱天冬蛋白酶-8 抑制剂 IETD-CHO(C8-i)处理的结果。灰色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞，黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 处理 24 小时的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示，其是从 3 个实验中选出一个代表实验的二个  
30 平行孔得来的。

图 2A 是直方图表示当 HO-1 活性被阻断时外源的一氧化碳可以代替



HO-1(血红素氧合酶-1)。灰色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞,黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 或鬼臼亚乙苷(etoposide)或血清剥夺(deprivation)处理的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示,其是从3个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。

图 2B 图形代表用 TNF- $\alpha$ 处理后再用一氧化碳处理 24 小时 $\beta$ TC3 细胞的 DNA 片段的 FACSscan<sup>TM</sup> 分析。

图 2C 是直方图其描述缺乏 HO-1 时外源的一氧化碳保护 $\beta$ TC3 细胞免于凋亡。将 $\beta$ TC3 细胞用 $\beta$ -半乳糖表达载体转染并暴露于外源一氧化碳。灰色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞,黑色柱代表如图中所示用 TNF- $\alpha$ 或鬼臼亚乙苷或血清剥夺处理的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示,其是从3个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。

图 3 是用 FACSscan<sup>TM</sup> 进行的 DNA 断裂分析,其显示外源一氧化碳保护小鼠胰岛免于凋亡。CHX = 环己酰亚胺。

图 4A 的直方图描述外源一氧化碳的抗凋亡作用由鸟苷酸环化酶活化所介导。ODQ = 鸟苷酸环化酶抑制剂 ODQ。

图 4B 的直方图描述 cGMP 类似物可以取代外源一氧化碳保护细胞免于凋亡。8-Br-cGMP = cGMP 类似物 8-Br-cGMP。

图 4C 的直方图描述 cGMP-依赖性蛋白激酶(cGK)介导一氧化碳的抗凋亡作用。将 $\beta$ TC3 细胞用 $\beta$ -半乳糖表达载体共转染。对于图 4A-C,灰色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞,黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 处理的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准一表示,其是从3个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。KT = 蛋白激酶 G 抑制剂 KT5823。

图 5A 的直方图描述暴露于一氧化碳 1 小时足以防止凋亡。

图 5B 的直方图描述凋亡诱导后一氧化碳保护 $\beta$ -细胞。

图 5C 的直方图显示与一氧化碳预温育防止-细胞凋亡。对于图 5A-C,灰色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞,黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 处理的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示,其是从3个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。

图 6A 是线性图显示将小鼠胰岛暴露于一氧化碳改善移植后的存活和功能。

图 6B 是线性图显示接受了事先暴露于一氧化碳的胰岛或对照胰岛的动物恢复的概率(血糖水平低于 200mg/dl)。\* 与对照相比  $P = 0.001$ 。

图 7 是直方图描述移植入 CVF 加 CSA 处理的大鼠体内的小鼠心脏

HO-1 的表达。将小鼠心脏移植入大鼠，并将大鼠在移植时用眼镜蛇毒因子 (Cobra Venom Factor)(CVF)处理加上移植后每天用环孢菌素 A(CsA)处理。用 RT-PCR 检测 HO-1 和 $\beta$ -肌动蛋白的 mRNA 的表达。符号-/-表示来自 HO-1-/-小鼠心脏的 RNA 作为阴性对照。柱形图代表用 $\beta$ -肌动蛋白的 mRNA 校正的 HO-1mRNA 的相对水平。

图 8 是一系列直方图描述在体内 SnPPIX 抑制 HO-1 酶活性。将小鼠心脏移植入未处理的大鼠(II)或用 CVF 和 CsA 处理(III)加上 FePPIX (IV)或 SnPPIX(V)处理的大鼠。供体和受体心脏内总 HO 活性在移植后 2 天测定，并分别与正常小鼠和大鼠心脏内基础 HO 活性对比(I)。结果表示为分析每种处理的三个动物的均值 $\pm$ 标准差(SD)。用非配对 Welsh t 检验进行统计学分析。

图 9 是一系列直方图描述 SnPPIX 和 FePPIX 不干扰抗移植植物抗体(Abs)的产生。如上述，将小鼠心脏移植入用 CVF 和 CsA 处理的大鼠。用细胞 ELISA 评价抗移植植物 IgM 抗体的血清水平。大鼠补体成分 C3 与小鼠内皮细胞的结合用细胞 ELISA 评价。补体溶血活性(CH50)用标准溶血测定来评价。结果表示为均值 $\pm$ SD(n=3)。

图 10A 是一系列直方图描述外源性 CO 不影响 SnPPIX 抑制 HO-1 酶活性的能力。将小鼠心脏移植入用 CVF 加 CsA 加 SnPPIX (II)或 SnPPIX 和 CO (III) 处理的大鼠体内。在移植后 2 天测定供体和受体心脏以及受体肝脏的总 HO 活性。按照所分析的样品将不同样品的 HO 活性与正常小鼠心脏(I)，大鼠心脏(I)，或肝脏(I)内基础 HO 活性对比。结果表示为分析每种处理的三个动物的均值 $\pm$ SD。用非配对 Welsh t 检验进行统计分析。

图 10B 是直方图描述外源性 CO 不影响 SnPPIX 抑制 HO-1 活性的能力。移植后 2 天分析产生图 10A 数据所使用的动物的碳氧血红蛋白含量。结果表示为均值 $\pm$ SD(n=3)。

图 11 是线性图描述内皮细胞中 HO-1 上调抑制血小板活化。将小鼠 2F-2B 内皮细胞不作处理(NT)或用 CoPPIX(50 $\mu$ M, 16h)处理上调 HO-1 活性，SnPPIX 处理抑制 HO-1 活性(50 $\mu$ M, 16h)或 CoPPIX(50 $\mu$ M, 12h)加 SnPPIX(50 $\mu$ M, 4h)处理以做 CoPPIX 上调 HO-1 活性特异性的对照。分离大鼠血小板，覆盖在小鼠内皮细胞上 5 分钟，并测定用 2 $\mu$ M 腺苷二磷酸(ADP)刺激后的聚集。

图 12 是直方图描述一氧化碳抑制内皮细胞凋亡。灰色柱代表单独用 Act.D 处理的细胞，黑色柱代表用 Act.D 加 TNF- $\alpha$ 处理的细胞。所示处，内皮细胞用 SnPPIX(50 $\mu$ M)处理并暴露于外源 CO(百万分之 10,000(ppm))。

## 5 发明详述

这里使用的短语“一氧化碳”(或“CO”)描述以其气体形式，压缩成液体形式，或溶解在水溶液中的一氧化碳分子。整个说明书中使用的短语“一氧化碳组合物”和“包含一氧化碳的药用组合物”用来描述含有一氧化碳的气体的，液体的，固体的，或半固体的组合物，并可以将其给予供体患者，尸体，或动物；给予器官；或给予器官的一部分，例如器官的组织，或组成器官的单一细胞，例如神经元，肝细胞，肌细胞，胰岛，或胰岛细胞如胰腺 $\beta$ -细胞。有经验的医师会识别药用组合物的哪种形式，例如气体，液体，或气体和液体两种形式对已知的应用是优选的。

这里使用的短语“有效量”和“有效的治疗”指在一定时间内(包括急性或慢性给药和定期或连续给药)使用的一氧化碳的量或浓度，其在给药背景下对于产生预想的作用或生理效果是有效的。本发明使用的一氧化碳的有效量包括，例如，在体内和/或体外有效增强器官或细胞存活和/或改善功能的量。在单一细胞或细胞团移植情况下，例如移植物供体和/或受体，一氧化碳的有效量是给予移植物供体和/或受体足以增强细胞或细胞团存活的量，例如减少细胞或细胞团缺失，和/或改善移植的细胞或细胞团的功能状况。在体外处理细胞的背景下，例如培养和/或使用胰岛细胞来移植，一氧化碳的有效量是用此量温育或贮存细胞以改善细胞的保藏，和/或减少例如通过细胞凋亡的细胞丢失，和/或增强功能。在器官和组织移植背景下，例如移植物供体和/或受体，一氧化碳的有效量是给予移植物供体和/或受体足以增强目的器官，组织或细胞存活的量，例如减少构成该器官或组织的细胞丢失，和/或改善器官的功能状况。在处理器官，组织或在活体外的细胞以贮存或用于移植的背景下，一氧化碳的有效量是足以增强器官或组织存活和/或功能的量。这里使用的术语“抑制”包括延缓发作，减少，预防，或减轻生物过程，例如细胞凋亡。对气体，一氧化碳的有效量一般按重量在范围约 0.0000001%至约 0.3%，例如按重量约 0.0001%至约 0.25%，优选至少约 0.001%，例如按一氧化碳重量至少 0.005%，0.010%，0.02%，0.025%，0.03%，

0.04%，0.05%，0.06%，0.08%，0.10%，0.15%，0.20%，0.22%，或0.24%。  
一氧化碳的优选范围包括按重量约0.001%至约0.24%，约0.005%至约  
0.22%，约0.01%至约0.20%，和约0.01%至约0.1%。其他优选范围包括按  
重量约0.005%至约0.24%，约0.01%至约0.22%，约0.015%至约0.20%，和  
5 约0.025%至约0.1%。对CO的液体溶液，有效量一般在范围约0.0001至约  
0.0044gCO/100g液体，例如至少0.0002，0.0004，0.0006，0.0008，0.0010，  
0.0013，0.0014，0.0015，0.0016，0.0018，0.0020，0.0021，0.0022，0.0024，  
0.0026，0.0028，0.0030，0.0032，0.0035，0.0037，0.0040，或0.0042 g CO/100  
g水溶液。优选的范围包括，例如，约0.0010至约0.0030g CO/100 g液体，  
10 约0.0015至约0.0026 g CO/100 g液体，或约0.0018至约0.0024 g CO/100 g  
液体。有经验的医师会理解根据实际应用，可以使用超出这些范围的量。

整个说明书中使用术语“患者”来描述动物，人类或非人类，其被按照  
本发明提供的方法治疗。本发明显然考虑到了兽医方面的应用。该术语包  
括但不局限于：鸟类，爬行动物，两栖类，和哺乳动物，例如人类，其他  
15 灵长类，猪，啮齿类例如小鼠和大鼠，兔，豚鼠，仓鼠，牛，马，猫，狗，  
绵羊和山羊。这里使用的术语“供体”或“供体患者”指为贮存和/或移植给受  
体患者的目的可以从其获得器官，组织或单一细胞的动物(人或非人类)。术  
语“受体”或“受体患者”指可以将器官，组织，细胞团或单一细胞移入其中的  
动物(人或非人类)。

20 术语“糖尿病”是一般性的术语来描述如本领域所知的糖尿病性疾病，  
例如，糖尿病。糖尿病以不能调节血糖水平为特点。两种主要的糖尿病类  
型是熟知的I型和II型糖尿病。I型糖尿病，或胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)，  
由于产生胰导素的 $\beta$ 细胞破坏使胰腺产生极少量或不产生胰岛素。II型糖尿  
病，或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)，胰腺产生一些胰岛素但是胰岛素  
25 不起作用。该术语也包括糖尿病引起的大量继发疾病，急性的或慢性的，  
例如，糖尿病并发症，如低血糖和高血糖，视网膜病变，血管病变，神经  
病变，和肾病。

这里使用的术语“细胞”或“动物细胞”指任何类型动物细胞，包括适于移  
植的动物细胞。所述细胞一般是从供体动物获得的原代细胞，但也可以是  
30 第二代细胞或者甚至是建立细胞系的细胞。可选择性地将它们在体外用改  
变其某些方面功能的表达载体转染。所述细胞包括但不局限于：例如胰岛

细胞, 例如胰岛的一部分细胞, 和肝细胞, 成纤维细胞, 骨髓细胞, 肌细胞, 和干细胞, 和包括脊髓的中枢神经系统的细胞(例如神经元)。整个说明书中使用术语“胰岛细胞”作为一般性术语来描述胰腺内称作胰岛的细胞群, 例如朗格汉岛(islets of langerhans)。朗格汉岛包含几种细胞类型, 例如

5  $\beta$ -细胞(其产生胰导素),  $\alpha$ -细胞(其产生胰高血糖素),  $\gamma$ -细胞(其产生生长抑素), F 细胞(其产生胰多肽), 肠嗜铬细胞(其产生 5-羟色胺), PP 细胞和 D1 细胞。术语“干细胞”是本领域已知的术语, 其指培养中具有无限分裂能力并产生特化细胞(specialized cells)的细胞。此术语包括的是, 例如, 全能的, 多能的(pluripotent), 多潜能的(multipotent), 和单能的干细胞, 例如, 神经

10 元, 肝, 肌肉, 和造血干细胞。

“分离的细胞”意思是从其(或其前体)自然产生的组织或器官取出的细胞。细胞可以仅仅被部分从其天然环境纯化并被认为是“分离的”。例如, 一旦将胰岛从胰腺取出并可以与其他胰岛物理分离时, 该完整胰岛即被认为是由“分离的”细胞构成。完整器官, 例如肾或心脏或部分器官例如一段血管

15 的细胞不认为是“分离的细胞”而仍被认为是器官的一部分。

整个说明书中使用术语“器官”作为一般性的术语来描述动物中具有特殊功能的任何解剖部分或成员。此术语的意思进一步包括器官的替代部分, 例如, 从器官获得的粘着组织。这种器官包括但不局限于肾, 肝, 心脏, 肠, 例如大或小肠, 胰腺, 和肺。此定义进一步包括骨骼和血管, 例如主

20 动脉移植。

整个说明书中使用术语“移植”作为普通术语来描述向患者植入器官, 组织, 细胞团, 或单一细胞的过程。本领域将术语“移植”定义为从供体向受体转移活的组织或细胞, 意欲维持受体内移植的组织或细胞功能的完整(见, 例如, The Merck Manual, Berkow, Fletcher, 和 Beers, Eds., Merck Research

25 Laboratories, Rahway, N. J., 1992)。整个说明书中使用术语“细胞移植”作为普通术语来描述向患者转移至少一种细胞例如胰岛细胞的过程。例如, 这种移植的完成可以通过从供体胰腺取出 $\beta$ -细胞(或整个胰岛)并将其植入胰腺不能产生足够胰岛素的受体患者。该术语包括本领域所知的所有移植范畴, 但输血除外。移植按部位和供体和受体之间遗传关系分类。该术语包括例

30 如, 自体移植(从患者一个部位切下并转移细胞或组织至该患者的同一或另一部位), 同种异体移植(在同一种种属成员间移植), 和异种移植(在不同种

属成员间移植)。

术语“器官排斥”，“移植排斥”或“排斥”是领域内认同的，并在整个说明书中作为普通术语使用来描述受体内器官，组织，或细胞的排斥过程。此定义包括的是，例如，排斥的三个主要类型，其在临床上通常定义为：超急性排斥反应，急性排斥反应，和慢性排斥反应(见，例如，Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt, Eds., Oxford University Press, 1994)。

这里使用术语“边缘(marginal)供体”和“边缘器官”作为普通术语来描述存在问题的供体或器官，所述问题使其在移植过程中的应用不是最佳的。例如，边缘供体可以包括大于 50 岁的供体，或患有可能影响移植物功能的慢性疾病，如糖尿病，HTA 和嗜酒(alcohol intake)的供体。边缘器官是，例如，(1)从这样供体来的器官，或(2)经历过长时间的热或冷缺血的器官，或(3)存在解剖异常(例如，小和多血管，例如在肾脏)的器官，其可使血管吻合困难，或在移植物血管上有动脉粥样硬化斑迹象的器官。

#### 气体组合物的制备

一氧化碳组合物可以是气体一氧化碳组合物。本发明方法中有用的压缩的或加压的气体可以从任何商业来源获得，并且放在任何适于贮存压缩气体的容器中。例如，可以从任何供应压缩气体，如医用氧气的来源获得压缩的或加压的气体。可以提供本发明的方法中使用的含一氧化碳的加压气体，以使目的最终组合物的所有气体(例如 CO 和 O<sub>2</sub>，和可选择的 N<sub>2</sub>，He，和/或 CO<sub>2</sub>)在同一容器中混合。如需要，本发明的方法可以用含单一气体的多个容器进行。例如，可以提供含一氧化碳，有或没有其他气体的一个容器，可以将其内容物选择性地与室内空气或其他容器的内容物混合，所述其他容器例如，含氧气，氮气，二氧化碳，压缩的气体的容器，或其他合适的气体或它们的混合物混合。

按照本发明给予患者的气体组合物一般含有按重量约 0%至约 79%的氮气，按重量约 21%至约 100%的氧气和按重量约 0.0000001%至约 0.3%(相当于约 0.001ppm(即 1ppb)至约 3,000ppm)的一氧化碳。优选地，气体组合物中氮气的量按重量约 79%，氧气的量按重量约 21%，一氧化碳的量按重量约 0.0001%至约 0.25%。一氧化碳的量优选至少约 0.001%，例如按重量至少约 0.005%，0.01%，0.02%，0.025%，0.03%，0.04%，0.05%，0.06%，0.08%，0.10%，0.15%，0.20%，0.22%，或 0.24%。一氧化碳的优选范围包括按重

量约 0.001%至约 0.24%，约 0.005%至约 0.22%，约 0.010%至约 0.20%，和约 0.015%至约 0.1%。应当注意含有浓度高于 0.3%(例如 1%或更高)的一氧化碳的气体组合物可以根据应用需要短期使用(例如，一或几次呼吸)。这对一氧化碳毒性不是危险因素的在活体外应用是尤其有用的。使用所述气体以形成体外细胞培养的氛围时，所述气体可以也含有二氧化碳，以帮助维持培养基的 pH 值。例如，二氧化碳可以按重量 1%至 10%存在，通常 5%。

可以使用气体的一氧化碳组合物创造包含一氧化碳气的气体环境。例如，创造包括合适水平一氧化碳气的氛围可以通过提供装有含一氧化碳气的加压气体的容器，并从容器释放加压气体至某室(chamber)或空间以在所述室或空间里形成包含一氧化碳气体的气体环境。或者，可以将所述气体释放入呼吸面具或呼吸管顶端的装置，因此在呼吸面具或呼吸管内创造包含一氧化碳气的气体环境并确保患者是此屋内暴露于一氧化碳有效水平的唯一的一个人。

可以用本领域已知的任何方法测定或监测气体环境或通气环路中一氧化碳水平。这些方法包括电化学检测，气相色谱，放射性同位素记数，红外线吸收，比色法，和以选择性膜为基础的电化学方法(参见，例如，Sunderman et al., Clin. Chem. 28:2026-2032, 1982; Ingi et al., Neuron 16:835-842,1996)。例如，通过气相色谱和放射性同位素记数可以检测低于百万分之几的一氧化碳水平。而且，本领域已知生物组织中在低于百万分之几范围内的一氧化碳水平可以用中红外气体感受器测定(参见，例如，Morimoto et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol 280:H482-H488,2001)。一氧化碳感受器和气体检测装置可以从许多商业来源获得。

#### 液体组合物的制备

一氧化碳组合物也可以是液体一氧化碳组合物。可以用任何本领域已知的方法将液体混入一氧化碳组合物中以使气体溶解在液体中。例如，可以将液体放在所谓的“CO<sub>2</sub>温箱”中，并暴露于连续的一氧化碳气流直至液体中的一氧化碳达到目的浓度。另一个例子是，可以将一氧化碳气直接吹入液体中直至液体中一氧化碳的浓度达到需要。可以溶解在给定水溶液中的一氧化碳的量随温度的降低而增加。而在另一个例子中，可以将合适的液体通过允许气体扩散的管子，而管子从含有一氧化碳的气体环境中通过(例如，利用诸如体外膜充氧器等装置)。一氧化碳扩散入液体产生液体一氧

化碳组合物。

液体可以是本领域技术人员已知的适合向患者给药(参见,例如, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994)或在活体外维持器官, 组织或细胞的任何液体。一般地, 所述液体是水溶液。

- 5 溶液的例子包括磷酸盐缓冲液(PBS), Celsior™ 溶液, Perfadex™ 溶液, Collins 溶液, 枸橼酸盐溶液, 和 University of Wisconsin(UW)溶液(Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994)。

液体组合物可以包括浓度范围约 0.0001 至约 0.0044gCO/100g 液体的一氧化碳, 例如, 所述浓度至少是 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0008, 0.0010,  
10 0.0013, 0.0014, 0.0015, 0.0016, 0.0018, 0.0020, 0.0021, 0.0022, 0.0024, 0.0026, 0.0028, 0.0030, 0.0032, 0.0035, 0.0037, 0.0040, 或 0.0042 g CO/100 g 水溶液。优选的范围包括, 例如, 约 0.0010 至约 0.0030g CO/100 g 液体, 约 0.0015 至约 0.0026 g CO/100 g 液体, 或约 0.0018 至约 0.0024 g CO/100 g 液体。水在 0°C 时, 饱和点是约 0.0044g CO/100 g 培养基。

- 15 可以将任何合适的液体经气体扩散饱和至一氧化碳的规定浓度。或者, 可以使用已经过质量控制的含有规定水平一氧化碳的预制溶液。可以通过连接于一氧化碳分析仪的气体可通透, 液体不能通透的膜所进行的测定来实现对剂量的精确控制。可以将溶液饱和至目的有效浓度并维持在该水平。在液体和气体组合物两者中, 惰性气体氮的存在可以改善一氧化碳向器官  
20 的组织中的释放。

#### 用一氧化碳组合物治疗患者

- 本发明涉及在收集, 贮存和移植过程的任何步骤使用一氧化碳组合物处理供体, 受体, 器官, 组织, 细胞团, 和/或单一细胞。可以从供体收集器官, 组织, 细胞团, 或单一细胞, 按照本发明在活体外用一氧化碳组合物  
25 进行处理, 并移植给受体。或者另外, 可以将器官, 组织, 细胞团, 或单一细胞仍在供体内时原位进行处理。选择性地, 可以在手术之前, 之中, 和/或之后, 例如, 在器官被受体血液再灌注后将一氧化碳组合物给予受体。也可以在收获器官, 组织, 细胞团, 或单一细胞之前或之中将一氧化碳组合物给予供体。

- 30 可以用本领域已知的任何方法从供体收获器官, 组织, 细胞团, 和/或分离的细胞并移植(参见, 例如, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt,



Eds., Oxford University Press, (1994)). 有经验的医师会知道收获和移植的方法可以根据许多情况变动, 例如器官, 组织或细胞的类型, 以及供体的类型。

5 本发明进一步目的是将这里描述的方法用于器官, 组织, 细胞团或在活体外分离的细胞, 例如, 人工生物器官, 如人工生物肝脏, 肾脏或胰腺(见, 例如, Sambanis et al, Cytotechnology 15:351- 363,1994)。可以将器官, 组织, 或细胞(或细胞团)在将其放入装置前, 或其在装置中被使用时用一氧化碳处理, 或者两者均可。另外或者, 可以在取下器官, 组织, 细胞团, 或单一细胞用于装置中之前给予供体动物一氧化碳。

10 此外或者, 可以将细胞按照下面描述进行培养并移植给受体。

可以用任何本领域已知向患者给予气体和/或液体的方法用一氧化碳组合物治疗患者。本发明涉及向患者全身给药一氧化碳液体或气体组合物(例如, 通过吸入和/或食入), 以及原位向患者的器官或组织局部给予组合物(例如, 通过食入, 吹入, 和/或向腹腔内导入)。

#### 15 一氧化碳的全身给药

可以将气体一氧化碳组合物全身给予患者, 例如, 进行或需要移植的患者。一般将气体一氧化碳组合物通过口或鼻腔吸入肺中给药, 在此一氧化碳容易地被吸收入患者的血流。在治疗性气体组合物中使用的活性化合物(CO)浓度根据一氧化碳的吸收, 分布, 失活, 和排泄(一般地, 通过呼吸)速率以及本领域技术人员已知的其他因素而定。应进一步理解, 对于任何具体的个体, 应该按照个体需要和所给药的组合物以及监管组合物给药人士的专业判断随时间调整具体的剂量方案; 这里提出的浓度范围仅是举例, 并不用来限制本发明的权利要求的范围或本发明的应用。根据例如, 患者疾病的严重程度或持续时间, 本发明考虑到了一氧化碳的急性, 亚急性和慢性给药。

25 可以向患者给予一氧化碳足够长的时间(包括无限地)以治疗疾病并取得所希望的药理或生物作用。

下面是可以用于向患者给予气体一氧化碳组合物的方法和装置的举例。

#### 30 通气机

可以购买与空气或其他含氧气体混合的标准罐装压缩气体(例如,

21%O<sub>2</sub>, 79%N<sub>2</sub>)的一氧化碳(浓度可变)。一氧化碳是非反应性的, 并且本发明方法所需浓度远低于燃烧范围(空气中含 10%)。在医院环境中, 如果气体输送至床边那么在此可以与氧气或室内空气在混合器内混合至目的浓度。患者通过通气机(Ventilator)吸入气体混合物, 所述通气机将根据患者的舒适程度和需要设置流速。这可以用肺描计图(graphics)判定(即, 呼吸速率, 潮气量, 等等)。可以在传输系统中设计防止患者不必要的吸入高于一氧化碳所需量的报警机制(Fail-safe mechanism)。监测患者的一氧化碳水平, 这可通过研究(1)碳氧血红蛋白(CO<sub>2</sub>Hb)(其可在静脉血中测定), 和(2)从通气机侧管中收集的呼出的一氧化碳来进行。根据患者健康状况和这些标志可以调整一氧化碳暴露。如果需要, 可以转换成 100%O<sub>2</sub> 吸入冲洗出患者的一氧化碳。一氧化碳是不被代谢的; 因此, 无论吸入多少, 除了很少百分比转变成 CO<sub>2</sub> 外都将最终被呼出。也可以将一氧化碳与任何水平的 O<sub>2</sub> 混合以提供一氧化碳的治疗性给药而不产生随之的缺氧状况。

#### 面罩和帐篷

15 如上制备含一氧化碳的气体混合物以允许患者用面罩或帐篷吸入。可以改变吸入的浓度并可以转换成 100%O<sub>2</sub> 吸入冲洗出一氧化碳。在面罩或帐篷处或附近用报警机制监测一氧化碳水平, 其防止吸入过高浓度的一氧化碳。

#### 便携式吸入器

20 可以将压缩的一氧化碳包装入便携式吸入器装置内并用表计量的剂量吸入, 例如, 允许间断治疗不在医院环境的受体。可以将不同浓度的一氧化碳包装入容器。所述装置可以象带有开关阀门和管子的装有适当稀释的 CO 的小罐(例如, 5 公斤以下)那样简单, 并且患者按照标准方案或需要可从该管子吸入一阵 CO。

#### 静脉内的人工肺

25 设计用于释放 O<sub>2</sub> 和清除 CO<sub>2</sub> 的人工肺(血中气体交换的导管装置)可用于一氧化碳运送。当植入导管时, 所述导管位于一个大静脉中并能向全身或局部传输已知浓度的一氧化碳。给药可以是在特殊位点局部短时间释放高浓度一氧化碳(此高浓度可以快速被血流稀释), 或者相对较长时间全身暴露于低浓度一氧化碳(参见, 例如, Hattler et al., Artif. Organs 18(11):806-812, 30 1994; 和 Golob et al., ASAIO J. 47(5):432-437,2001)。

### 常压室

在某些情况下，希望将整个患者暴露于一氧化碳。患者在密不透气的充满一氧化碳(以对患者无危险的水平，或处于对旁观者暴露无风险的可接受风险水平)的室内。结束暴露时，在允许患者退出暴露系统前可以将所述室内充满空气(例如，21%O<sub>2</sub>，79%N<sub>2</sub>)，并用一氧化碳分析仪分析样品以确

5 保无一氧化碳残留。

### 水溶液

本发明进一步打算制造含有一氧化碳的水溶液用于患者的全身给药，例如，口服给药和/或注射给药，例如，静脉内，动脉内，腹膜内和/或皮下

10 给药。

可以将保存缓冲液和培养基通过气体扩散饱和至一氧化碳的规定浓度或者预制已经质量控制含有规定水平一氧化碳的贮存溶液。剂量准确控制的实现可以通过用连接于一氧化碳分析仪的气体可通透，液体不能通透的膜测量。可以将缓冲液和溶液饱和至目的有效浓度并维持在此水平。对于

15 需要灌注的给定器官，组织，或细胞制品，可以将预制的饱和溶液放在身边备用以维持一氧化碳水平。如果一氧化碳水平下降，可以添加新鲜溶液以置换一氧化碳浓度已经下降者。一旦器官，组织或细胞的制备已经完成，可以将其维持在不透气容器中的溶液里运输。惰性气体氮气的存在使其更有效摄取一氧化碳。

### 用一氧化碳原位和在活体外对器官，组织和分离的细胞的局部处理

本发明的特点是移植器官，组织，细胞团和/或分离的细胞的方法。该方法可以包括移植前将器官，组织，细胞团和/或分离的细胞暴露于一氧化碳的步骤。这种暴露可以发生在原位(*in situ*)和/或在活体外(*ex vivo*)。可以将器官，组织，和/或分离的细胞暴露于含有一氧化碳气的氛围，液体一氧化

25 碳组合物，例如，其中溶解有一氧化碳的液体灌注液，贮存溶液，或洗液，或两者都有。

可以用本领域任何已知方法在活体外和/或原位将器官或组织暴露于液体一氧化碳组合物。例如，所述暴露可以在活体外有足够容积以完全或部分地将器官或组织浸没在一氧化碳组合物中的任何室或空间内进行。如另一个例子，将器官暴露于一氧化碳组合物可以通过将器官放置于任何合适

30 的容器内，并用一氧化碳组合物“冲洗”器官，因此该器官被暴露于连续的一

氧化碳组合物流中。

或者，可以用一氧化碳组合物灌注器官。术语“灌注”是本领域已知术语，涉及液体的通过，例如，一氧化碳组合物通过器官或组织的血管。在活体外和原位灌注器官的方法是本领域熟知的。可以用一氧化碳组合物在活体外灌注器官，例如，用连续低温机械灌注(参见 Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt, Eds., Oxford University Press, 1994)。可选择地，在原位或在活体外灌注时，可以在用一氧化碳组合物灌注前用洗液灌注器官，所述洗液例如，无一氧化碳的 UW 溶液，以去除器官中的供体血液。进行此步骤防止供体血红蛋白竞争一氧化碳。另一种选择，所述洗液可以是一氧化碳组合物。可以将合适的液体通过允许气体扩散的管子；该管子流过含有一氧化碳的气体(例如，通过一个室，如体外用膜氧合)，以产生液体一氧化碳组合物，其然后可以被输入器官(例如，将管子连接于器官来灌注器官)。

可以将器官或组织置于，例如，浸没在不含有一氧化碳的培养基或溶液中，并放在一个室内，该室使这些培养基或溶液暴露于含有一氧化碳的气体环境。或者另外，可以将一氧化碳“吹入”培养基或溶液中。原位暴露的进行可以用任何本领域已知的方法进行，例如，可以原位用液体一氧化碳组合物冲洗或灌注器官(参见 Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt, Eds., Oxford University Press, 1994)。

本发明涉及可以将器官或组织暴露于液体一氧化碳组合物的任何或全部上述方法，例如，冲洗，浸没，或灌注，用于给定的移植过程。

本发明进一步涉及制备固体或半固体一氧化碳组合物。例如，可以将如上描述的一氧化碳组合物液体制成固体或半固体组合物，器官或组织可以被覆盖或包埋在其中。或者，可以将半固体一氧化碳组合物浸入器官中。例如，可以向液体中加入固化剂如胶凝剂(例如胶原或藻酸盐)制备固体或半固体组合物。

### 细胞培养

本发明以体外维持或培养动物细胞的方法为特点。该方法可以包括以下步骤：提供装有含一氧化碳的加压气体的容器，提供体外动物细胞和从容器释放加压气体以形成包含一氧化碳气的氛围。然后将动物细胞培养或单纯维持在含一氧化碳气的氛围。

5 该方法的进行可以在任何适于产生含有适当水平一氧化碳气的气体环境的室或空间内。这种室或空间包括，例如，孵箱，混合筒，和任何适于培养或维持细胞的容器，例如滚动瓶，细胞培养瓶，培养皿，和试管。例如，可以使用 CO<sub>2</sub> 孵箱，其中从含有气体的容器连续供应一氧化碳气。如另一个例子，可以使用滚动瓶，其中包含一氧化碳气以在滚动瓶内产生适当的气体。

10 有经验的医师会理解根据培养的细胞类型可以选择和/或变动培养条件，例如温度(参见，例如，Cells: A Laboratory Manual, Spector and Leinwand, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997)。例如，可以将小鼠胰岛瘤细胞系 βTC3(DSMZ, Braunschweig, Germany) 在湿润的 5%CO<sub>2</sub>/95%空气中 37°C 温育。

15 可以将动物细胞处理，例如，悬浮或浸浴在液体培养基中。所述培养基可以是本领域技术人员已知的任何适合培养，保存，或洗涤目的细胞的培养基(参见，例如，Cells: A Laboratory Manual, Spector and Leinwand, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1997)。这类培养基包括但不局限于：各种缓冲液，Eagle's 极限必需培养基(MEM)，Dulbecco/Vogt 改良的 Eagle's 极限必需培养基(DMEM)，或 Roswell Park Memorial Institute(RPMI)培养基。这类培养基也可以包括适当的添加物，例如，胎牛血清(FBS)，各种氨基酸，抗生素，和/或维生素。例如，培养基可  
20 以是 RPMI 1640 培养基(Life Technologies, Grand Island, New York)，添加了 2mM L-谷氨酰胺，100U/ml 青霉素 G，100U/ml 链霉素和 10%胎牛血清(FCS)(Life Technologies)。在那些细胞处在液体培养基中的本发明的实施方案中，可以使液体培养基与含一氧化碳的加压气体接触而将细胞暴露于一氧化碳组合物，例如，按照本发明的方法与从加压气体源释放的一氧化碳  
25 气接触。

在本发明的另一实施方案中，液体培养基本身是如上描述制备的一氧化碳组合物。可以在向培养基中加入细胞之前或之后用一氧化碳注入培养基。

30 本发明进一步涉及制备固体或半固体培养基，其中所述固体或半固体培养基是一氧化碳组合物。例如，可以将如上述是一氧化碳的液体培养基制成固体或半固体培养基，可以将细胞覆盖或包埋于其中。例如，通过向

培养基中加入胶凝剂例如胶原，藻酸盐或琼脂完成此过程。

### 血红素氧合酶-1，血红素氧合酶-1 相关化合物，和其他化合物的使用和处理

5 本发明也涉及诱导或表达血红素氧合酶-1(HO-1)以及一氧化碳给药。可以在患者体内诱导或表达 HO-1 而向患者提供 HO-1，或直接向患者给予外源的 HO-1。这里使用的术语“诱导”意思是在分离的细胞或组织，器官或动物的细胞内利用细胞内源的(例如，非重组的)编码蛋白质的基因，使增加如 HO-1 等蛋白质的产量。

10 可以用本领域已知的任何方法在患者如供体和/或受体体内诱导 HO-1。例如，可以用氯高铁血红素，铁原卟啉，或钴原卟啉诱导 HO-1 的产生。许多非血红素试剂包括重金属，细胞因子，激素，一氧化氮，COCl<sub>2</sub>，内毒素和热休克也是 HO-1 表达的强诱导剂(Otterbein et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279: L1029-L1037, 2000; Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 517-554, 1997; 15 和 Tenhunen et al., J. Lab. Clin. Med. 75: 410-421, 1970)。HO-1 也被各种产生氧化应激的试剂和条件高度诱导，包括过氧化氢，谷胱甘肽消耗剂，UV 辐射和缺氧(Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 517-554, 1997;和 Keyse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 99-103, 1989)。“包括 HO-1 诱导剂的药用组合物”意思是 20 含有任何能诱导患者 HO-1 的试剂的药用组合物，例如，上面描述的任何试剂，例如氯高铁血红素，铁原卟啉，和/或钴原卟啉。

25 在细胞中 HO-1 的表达可以经基因转移而增强。如这里使用的，术语“表达”意思是在分离的细胞或组织，器官或动物的细胞内利用外源引入的基因(例如，重组的基因)，使蛋白质例如，HO-1 或铁蛋白产量增高。为了使任何免疫反应降至最低，优选 HO-1 或铁蛋白是与移植受体同一种属的(例如，人类，小鼠，大鼠，等等)。可以用构建启动子(例如巨细胞病毒启动子)或组织特异的启动子(例如，用于哺乳动物细胞的乳清蛋白启动子或用于肝细胞的白蛋白启动子)驱动表达。可以将编码 HO-1 或铁蛋白的合适的基因治疗载体(例如，逆转录病毒，腺病毒，腺相关病毒(AAV)，痘(例如牛痘)病毒， 30 人类免疫缺陷病毒(HIV)，小鼠极小病毒，乙型肝炎病毒，流感病毒，单纯疱疹病毒-1，和慢病毒)给予患者，通过口服，吸入，或在适于治疗移植排

斥的局部注射。尤其优选的是局部直接向要移植的供体器官，组织或细胞给药，或向受体内移植的位点给药。同样，可以给予编码 HO-1 或脱铁铁蛋白的质粒载体，例如，做为在脂质体中的，或在微粒中的裸露的 DNA。

5 进一步，可以用本领域已知的任何方法向患者直接给予外源的 HO-1 蛋白。除了或替代上面描述的在患者体内诱导或表达 HO-1 外，还可以直接给予外源的 HO-1。可以直接向患者给予 HO-1，例如以脂质体形式，和/或作为融合蛋白，如 TAT-融合蛋白(参见，例如 Becker-Hapak et al., Methods 24: 247-256, 2001)。

10 或者另外，为了预防或治疗疾病，可以联合或替代一氧化碳给予患者 HO-1 的任何代谢产物，例如胆红素，胆绿素，铁，和/或铁蛋白。而且，本发明考虑到向患者给予除铁蛋白外的铁结合分子，例如去铁敏(desferoxamine)(DFO)，右旋糖酐铁，和/或脱铁铁蛋白。可以局部或全身给予患者任何上述化合物。

15 本发明也涉及与一氧化碳，HO-1 和/或 HO-1 相关化合物联合，向患者，器官，组织和/或分离的细胞给药一氧化氮(NO)。该技术包括与给药 HO-1 和/或任何或全部血红素降解产物例如 CO，胆绿素，胆红素，铁和铁蛋白联合，向供体，受体，或在活体外的器官，组织或细胞提供 NO。

20 这里使用术语“一氧化氮”(或“NO”)描述以其气体状态或溶解在水溶液中的一氧化氮分子。一般将包括 NO 的气体组合物通过口或鼻腔吸入肺中给药，在此，一氧化氮可以直接发挥作用或容易地被吸收入患者的血流。本发明方法中有用的压缩或加压气体，如 NO(和/或 CO，如上面详细描述)可以从任何商业来源获得，并且放在任何适于贮存压缩气体的容器中。如需要，本发明的方法可以用含单一气体的多个容器进行。或者，可以在一个容器内组合 CO 和 NO，如需要可以用惰性气体稀释。

25 吸入用的 NO 是可以商业获得的(例如，INOMax™, INO Therapeutics, Inc., Clinton, NJ)。可以从供应商获得气体，其一般是在纯 N<sub>2</sub> 气体中含 200-800ppmNO 的混合物。NO 源可以是基本上 100%NO，或用 N<sub>2</sub> 或任何其它惰性气体(例如氩气)稀释至目的浓度。以无任何 O<sub>2</sub> 或氮的高氧化物污染的混合物获得和贮存 NO 是非常重要的，因为氮的高氧化物(其可由 O<sub>2</sub> 和 NO 反应形成)对肺组织是有潜在危害的。如需要，可以在向患者给药前用  
30 已知的方法用化学发光分析证明 NO 的纯度。化学发光 NO-NO<sub>x</sub> 分析仪可

商业获得。(例如, 14A型, Thermo Environmental Instruments, Franklin, MA)。可以在患者临吸入前将 NO-N<sub>2</sub> 混合物与含 O<sub>2</sub> 的气体(例如 100%O<sub>2</sub> 或空气)混合, 例如使用事先已校准过的流速计。在呼吸混合物中的 NO 的终浓度可以用本领域熟知的化学的或化学发光技术检验(例如, Fontijin et al., Anal Chem 42:575, 1970)。或者, 可以用电化学分析仪的方式监测 NO 和 NO<sub>2</sub> 的浓度。通过暴露于 NaOH 溶液, baralyme 或 sodalime 可以净化如 NO<sub>2</sub> 等的任何杂质。作为额外对照, 也可以评价最终气体混合物中的 FiO<sub>2</sub>。

可以用适于向患者给予气体的本领域任何方法给予含有 NO 的药用组合物。通过吸入给予 NO 的安全有效方法描述于美国专利 5,570,683; 美国专利 5,904,938; 和 Frostell et al., Circulation 83:2038-2047, 1991。向患者给予气体(例如 CO)的一些举例的方法上面有详细描述, 并且其可用于给予 NO。可以用于向患者给予含有 NO 的药用组合物的方法和装置的例子包括通气机, 面罩和帐篷, 便携式吸入器, 静脉内的人工肺(参见, 例如, Hattler et al., Artif. Organs 18(11):806-812, 1994; 和 Golob et al., ASAIO J. 47(5):432-437, 2001), 和常压室。但是, NO 的特性可以允许/必需将这些方法改动。在医院或紧急情况下, 例如, 通过将一罐压缩的 N<sub>2</sub> 中的 NO 气体, 和第二罐氧气或氧气/N<sub>2</sub> 混合物(例如空气)连接至设计用于混合两个来源气体的吸入器来完成 NO 气的给予。通过控制每个来源气体的流量, 可以维持患者吸入 NO 浓度于最佳水平。可以用标准的低流量混合器(例如, Bird Blender, Palm Springs, CA)将 NO 与室内空气混合。可以用电 NO 发生器从 N<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>(即, 空气)产生 NO。合适的 NO 发生器在美国专利 5,396,882 中有描述。此外, 可以从装备有 NO 源的吸入器间断提供 NO, 所述 NO 源例如压缩的 NO 或电 NO 发生器。如果联合 NO, 口服或吸入给予第二种化合物(例如, 如下面进一步详细描述的磷酸二酯酶抑制剂)则使用吸入器尤其有利。

优选地, 在含有 NO 气体的药用组合物中, 在吸入时 NO 的浓度大约是 0.1ppm 至大约 300ppm, 例如, 0.5ppm 至 290ppm, 1.0ppm 至 280ppm, 5ppm 至 250ppm, 10ppm 至 200ppm, 或 10ppm 至 100ppm, 且存在于空气, 纯氧气, 或其他合适的气体或气体混合物中。通过吸入给予 NO 的合适起始剂量可以是 20ppm(见, 例如, INOmax<sup>TM</sup> 的包装插页所述), 并且根据年龄和患者的状况, 治疗的疾病或异常, 和内科医生认为与治疗相关的其他因



素，所述剂量可变动，例如，从 0.1ppm 至 100ppm。本发明涉及到急性，亚急性和慢性给予 NO。可向患者给予一氧化碳足够长时间(包括无限地)以改善状况和显示出想要的药理或生物作用。可短时间内临时增加浓度，例如 200ppm NO 5 分钟。希望立即发挥作用时可以这样做。患者暴露于 NO 5 的优选时间包括至少 1 小时，例如，至少 6 小时；至少 1 天，至少 1 周，2 周，4 周，6 周，8 周，10 周或 12 周；至少 1 年；至少 2 年；和至少 5 年。在此期间可将患者连续或间断暴露于所述气体环境中。可通过自发或机械通气给予含有 NO(和/或 CO)的药用组合物。

当给予吸入的 NO 时，希望监测 NO 吸入的效果。在特殊的个体，这种监测可用于确定目的效果和鉴定可能发生的不希望的副作用。在已知个体，这种监测对调整剂量水平，持续时间和吸入 NO 给药频率也是有用的。

可以将气体 NO 溶解在水溶液中，并以此形式利用。例如，可以用这样的水溶液在活体外浸浴器官，组织或细胞，或用于原位灌注器官或组织。该溶液可以含有其它活性试剂例如 CO，HO-1，血红素，胆绿素，和/或胆红素。 15

可能希望延长患者吸入的 NO 的有效作用。决定如何延长吸入的 NO 的有益作用时，考虑 NO 体内作用之一是激活鸟苷酸环化酶是有用的，其刺激 cGMP 的产生。至少 NO 的某些有益的作用是其刺激 cGMP 生物合成的结果。因此，可以联合 NO 吸入给予磷酸二酯酶抑制剂以抑制 cGMP 被内 20 源的磷酸二酯酶降解。

可以用任何合适的方法将磷酸二酯酶抑制剂给予患者，包括经口，经粘膜，静脉内，肌肉内，皮下或腹膜内途径。或者，可以由患者吸入抑制剂。对于吸入，将磷酸二酯酶抑制剂制成干粉或气雾化或喷雾化的溶液是有利的，其具有适合在肺泡最佳沉积的小于 10 $\mu$ m 的粒子或小滴，并且可以在含有 NO 的气体中被随意吸入。 25

可能希望延长患者吸入的 NO 的有效作用。决定如何延长吸入的 NO 的有效作用时，考虑 NO 体内作用之一是激活鸟苷酸环化酶是有用的，其刺激 cGMP 的产生。至少 NO 的某些有益的作用是其刺激 cGMP 生物合成的结果。因此，可以联合 NO 吸入给予磷酸二酯酶抑制剂以抑制 cGMP 被内 30 源的磷酸二酯酶降解。

可以用任何合适的方法将磷酸二酯酶抑制剂给予患者，包括经口，经

粘膜，静脉内，肌肉内，皮下或腹膜内途径。或者，可以由患者吸入抑制剂。对于吸入，将磷酸二酯酶抑制剂制成干粉或气雾化或喷雾化的溶液是有利的，其具有适合在肺泡最佳沉积的小于 10 $\mu$ m 的粒子或小滴，并且可以在含有 NO 的气体中被随意吸入。

5 合适的磷酸二酯酶抑制剂是 Zaprinast<sup>TM</sup>(M&B 22948; 2-o-丙氧基苯-8-杂氮嘌呤-6-酮(2-o-propoxyphenyl-8-azapurine-6-one); Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham Essex, UK)。Zaprinast<sup>TM</sup>在血管平滑肌细胞中选择性抑制 cGMP 水解而最少影响环一磷酸腺苷的降解(Trapani et al., J Pharmacol Exp Ther 258:269, 1991; Harris et al., J Pharmacol Exp Ther 249:394, 1989; Lugnier et al.,  
10 Biochem Pharmacol 35:1743, 1986; Souness et al., Br J Pharmacol 98:725, 1989)。当按照本发明使用 Zaprinast<sup>TM</sup>时，优选的给药途径是静脉内或口服。合适的剂量范围可以由本领域普通技术人员判定。可以在 0.05N NaOH 中制备 zaprinasto 的贮存溶液。然后临用前将贮存液用 Ringer's 乳酸盐溶液稀释至所需的 zaprinasto 终浓度。

15 本发明可以用其他磷酸二酯酶抑制剂进行。各种磷酸二酯酶抑制剂是本领域已知的，包括 Viagra®(sildenafil citrate)潘生丁(dipyridamole)和茶碱。合适的给药途径和合适的剂量范围可以由本领域普通技术人员判定。

可以如下进行与磷酸二酯酶抑制剂一起的 NO 给药。给予在空气中 20ppm 的 NO 45 分钟。在 45 分钟期间的开始时，静脉输注给予  
20 zaprinasto 1.0mg/Kg 体重超过 4 分钟，随后在 45 分钟的其余时间里 0.004mg/Kg/min 连续输注。或者，在 45 分钟期间的开始时，给予潘生丁 0.15mg/Kg 体重超过 4 分钟，随后在 45 分钟的其余时间里 0.004mg/Kg/min 连续输注。zaprinasto 或潘生丁在盐水溶液中给药。

在移植情况下，本发明进一步涉及将增强移植物存活/功能的本领域已  
25 知的其他方法与这里描述的方法一起使用。这些方法包括但是不局限于免疫抑制治疗和供体特异的输血(DSTs)。例如，在给予受体 CO, HO-1, 其他血红素相关产物，和/或 NO 之前，之中和/或之后可以向受体给予 DST。这种给药，例如与这里描述的治疗一起给予 DST(s)，可以在移植之前，之中和/或之后完成。

30

实施例 I 一氧化碳保护移植后胰腺 $\beta$ 细胞免于凋亡和改善胰岛功能/存

## 活

### 细胞培养

将鼠胰岛瘤细胞系  $\beta$ TC3(DSMZ, Braunschweig, Germany) 培养在 Dulvecco's 改良的 Eagle's 培养基(DMEM)(Life Technologies, Grand Island, New York)中, 其添加了 2mM L-谷氨酰胺, 100U/ml 青霉素 G, 100U/ml 链霉素和 10%胎牛血清(FCS)(Life Technologies), 并在湿润的 5%CO<sub>2</sub>/95%空气于 37°C 保温。此小鼠  $\beta$ 细胞系源于携带杂合胰岛素启动子猴病毒 40 肿瘤抗原的转基因小鼠, 被认为是培养大约 50 代仍维持了已分化的  $\beta$ 细胞的特点。以与体内  $\beta$ 细胞相同的方式, 该细胞从胰岛素原 I 和 II 产生成熟胰岛素并且可被葡萄糖诱导最高至 30 倍(Efrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9037-41, 1988)。与其他经常使用的转化的  $\beta$ 细胞系如 RIN-m5F 和 HIT 相比,  $\beta$ TC3 细胞系分泌的胰岛素水平更接近于正常  $\beta$ 细胞。因此, 这些细胞对于研究  $\beta$ 细胞调节和基因表达是有用的(D'Ambra et al., Endocrinology 726:2815-22, 1990)。

15 由 Joslin 糖尿病中心的胰岛分离核心设备提供 C57BL/6 小鼠的胰岛。

### 结晶紫活力染色

将  $\beta$ TC3 以  $2 \times 10^5$  细胞接种 (Nunc, Marsh Products, Rochester, NY, USA)。将细胞用 500 $\mu$ l PBS 洗涤一次并用溶在 20%乙醇中的 0.05%结晶紫 200 $\mu$ l 室温染色 10 分钟。漂洗结晶紫。为从细胞上洗脱染料, 每孔加入 100 $\mu$ l 50%乙酸。将 50 $\mu$ l 转移至 96 孔微量滴定板中并用微量滴定板读数仪(EL 340 biokinetics reader, Bio-Tek Instruments)在 562nm 处读取吸光度。

### 表达质粒

25 将  $\beta$ -半乳糖苷酶表达载体(Clontech Laboratories, Palo Alto, California)克隆到 pcDNA3 载体上(Sato et al., J. Immunol. 166:4185-4194, 2001) (Invitrogen, Carlsbad, California)。从 prHO-1 载体(Shibahara et al., J. Biochem. 113:214-218, 1993)上切下编码大鼠 HO-1 全长 cDNA 的 1.0kbp 的 XhoI-HindIII 片段, 并亚克隆到 pcDNA3 载体上。

### 瞬时转染

30 在 16mm 孔中接种  $3 \times 10^5$   $\beta$ TC3 细胞, 15-20 小时后按照生产商的说明用 Lipofectamine plus<sup>TM</sup> 试剂(Life Technologies)进行转染。用空的 pcDNA3 载体维持总 DNA 恒定。用无凋亡刺激的对照转染的细胞数(100%存活)对每个

DNA 制品的活细胞百分比进行标准化以评价活细胞的百分比(Soares et al., Nature Med. 4:1073-1077, 1998; Sato et al., J. Immunol. 166:4185-4194, 2001)。

### 流式细胞术

将βTC3 培养物与重组的 TNF-α(500 或 1000U/ml)(R&D Systems)保温  
5 24 小时并且将胰岛培养物用 TNF-α(5000U/ml)(R&D Systems)和环己酰亚胺  
(CHX)(50μg/ml)刺激 48 小时。收集βTC3 或胰岛, 分散, 固定于 70%乙醇,  
并用 DNA 染色缓冲液(PBS, pH7.4, 含有 0.1% Triton X-100, 0.1mM EDTA,  
50μg/ml 碘化丙啶, 50mg/ml Rnase A)重悬。在装有 Cell Questo 软件(Becton  
Dickinson, Palo Alto, CA)的 FACScan™ 分析仪上分析 DNA 含量。DNA 含量  
10 (2N)正常的细胞计作活的, 而亚倍体(<2N, 称作 A<sup>0</sup>)DNA 含量的细胞计作  
凋亡的。为排除碎片和无细胞凋亡片段, 将所有 FL-2 区域的轮廓里低于小  
鸡红细胞核的样品不作分析。

### 细胞处理和试剂

将小鼠重组 TNF-α(R&Dsystems)溶解于 1%牛血清白蛋白的 PBS 中并  
15 在转染后 24 小时加入培养基中(17.5ng/ml=500U)。将半胱天冬蛋白酶-3 抑  
制剂 Z-DEVD-FMK 和半胱天冬蛋白酶-8 抑制剂 IETD-CHO(Calbiochem, San  
Diego, California)溶解于二甲基亚砷(DMSO, Sigma)中并在用 TNF-α处理前 2  
小时加入培养基中(分别用 10μM 和 1μM)。将锡原卟啉 (SnPPIX) (Porphyrin  
Products, Logan, Utah)(10mM)溶解于 100mM NaOH 中并在转染后 6 小时加  
20 入培养基(50μM)中。将鸟苷酸环化酶抑制剂 1H[1,2,4]噁二唑[4,3-α]喹啉  
-1(ODQ; Calbiochem)溶解于 DMSO 中并在转染后 6 小时加入培养基中  
(100μM)。将 cGMP 类似物 8-溴鸟苷-3'-5'-环一磷酸 (8-Br-cGMP)(Sigma)溶  
解于水中并在诱导凋亡前 30 分钟加入培养基中(10μM)。将蛋白激酶 G 抑制  
25 剂 KT5823(Calbiochem)溶解于 DMSO 中并在转染后 6 小时加入培养基中  
(1.6μM)。

### CO 暴露

如别处所述(参见, 例如, Otterbein et al., Nature Med. 6:422-428,2000),  
将细胞和胰岛暴露于用 5%CO<sub>2</sub> 平衡的压缩空气中的 1%一氧化碳。将胰岛  
在用一氧化碳预饱和(4℃过夜, 1%CO, 5%CO<sub>2</sub>)的 RPMI 培养基中 37℃保  
30 温 2 小时, 随后用 1%CO, 5%CO<sub>2</sub> 继续处理。

### 小鼠和糖尿病的诱导

雄性 C57BL/6 购自 Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts) 并按照 NIH 的规则饲养。实验经 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC) 允许。单纯腹腔内注射溶解于枸橼酸盐缓冲液中的 Streptozotocino(Sigma)(220mg/Kg) 使受体小鼠(8 周龄)产生糖尿病。如果全血标本中连续 2 次获得非空腹血糖水平高于 350mg/dl 则小鼠接受移植。

### 胰岛分离

朗格汉胰岛(C57BL/6 小鼠)由哈佛医学院胰岛移植的 JDRF 中心的胰岛核心实验室提供并且按照以前描述的分离(Gotoh et al., Transplantation 40:437-438, 1985)。

### 10 边缘量(marginal mass)的同源(syngeneic)胰岛移植

用解剖显微镜手工摘取直径 150-250 $\mu$ m 的胰岛 250 个。按照以前描述的(Kaufman et al., J. Exp. Med. 172:291-302, 1990)将胰岛移植在肾包囊下。对每种胰岛制备物移植给同样数量的对照和处理动物。

### 移植物功能结果分析

15 移植物功能定义为达到连续 3 天中第一个非空腹血糖水平 <200mg/dl 的时间点。实验的最初终点定义为血糖量正常的时候。

### 统计分析

将血糖数据总结为接受未处理或处理的胰岛的小鼠的均值 $\pm$ 标准差。用 Kaplan-Meier 生命表计算胰岛功能恢复的时间并用 log-秩(rank)检验计算组间差异, 分析中将三种胰岛制备物作为分别的层次分析, 并且恢复的中位数时间用 95%可信区间表示。

### TNF- $\alpha$ 诱导 $\beta$ TC3 细胞凋亡

25 研究 TNF- $\alpha$ 对 $\beta$ TC3 细胞的作用。使用下面的方法产生图 1A-C 描述的数据。图 1A: 将 $\beta$ TC3 细胞用递增浓度的 TNF- $\alpha$ 处理。活化后 24 小时用结晶紫将活细胞染色。于 562nm 测定消光(extinction)并用未处理的细胞标准化。图 1B: 将 $\beta$ TC3 细胞用 TNF- $\alpha$ 处理, 24 小时后用碘化丙啶染色并分析 DNA 片段(FACScan<sup>TM</sup>)。图 1C: 将 $\beta$ TC3 用 $\beta$ -半乳糖表达载体(pcDNA3/ $\beta$ -gal)和对照(pcDNA3)共转染。如所示, 将细胞用半胱天冬蛋白酶-3 抑制剂 Z-DEVD-FMK(C3-i)或半胱天冬蛋白酶-8 抑制剂 IETD-CHO(C8-i)处理。  
30 色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞, 黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 处理 24 小时的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示, 其是从 3 个实验中选出一个代表实验的二个平行孔

得出的。

在胰岛瘤细胞系βTC3上，TNF-α以剂量依赖方式诱导高水平的细胞死亡(Stephens et al., *Endocrinology* 140:3219-3227, 1999)(图 1A)。用碘化丙啶(PI)染色证实了DNA的断裂(图 1B)，说明TNF-α诱导β-细胞死亡通过细胞凋亡。

- 5 如描述的发现用特异的半胱天冬蛋白酶-8抑制剂(IETD-CHO)阻断半胱天冬蛋白酶-8可防止细胞凋亡(96%抑制)，而用特异的半胱天冬蛋白酶-3抑制剂(Z-DEVD-FMK)阻断半胱天冬蛋白酶-3仅仅部分防止细胞凋亡(53%抑制)，说明TNF-α介导的细胞凋亡严格依赖半胱天冬蛋白酶-8的活化，部分依赖半胱天冬蛋白酶-3的活化(图 1C)。

#### 10 一氧化碳保护βTC3细胞

- 研究是否外源的一氧化碳可以保护β-细胞免于凋亡(图 2A-C)。利用下面的方法产生图 2A-C描述的数据。图 2A: 当HO-1活化被阻断时外源的一氧化碳可以代替HO-1。将βTC3细胞用β-半乳糖表达载体加对照或HO-1表达载体共转染(Brouard et al., *J. Exp. Med.* 192:1015-1026, 2000)。如所示，
- 15 HO-1的酶活性被锡原卟啉(SnPp)所抑制。如所示，将β-细胞按照以前描述的暴露于外源一氧化碳(1%)(Otterbein et al., *Nature Med.* 6:422-428, 2000)。灰色柱代表未处理的β-细胞，黑色柱代表用TNF-α处理的β-细胞。结果用均值±标准差表示，其是从3个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。图 2B: 在DNA断裂分析中外源一氧化碳保护β-细胞免于凋亡。将βTC3用
- 20 TNF-α处理。刺激后直接将βTC3暴露于外源一氧化碳24小时。将对照的βTC3用同样的方式处理但是不暴露于一氧化碳。24小时后将细胞用碘化丙啶染色并用FACScan™分析DNA的片段。图 2C: 缺乏HO-1时外源的一氧化碳保护βTC3细胞免于凋亡。将βTC3细胞用β-半乳糖表达载体转染并暴露于外源一氧化碳(Stephens et al., *Endocrinology* 140:3219-3227, 1999)。灰色柱代表未处理的β-细胞，黑色柱如所示代表用TNF-α或鬼臼亚乙苄或血清剥夺处理的β-细胞。结果用均值±标准差表示，其是从3个实验选出一个代表实验的二个平行孔得来的。

- 为评价是否HO-1的表达会保护β-细胞免于TNF-α介导的凋亡，将βTC3细胞用HO-1表达载体瞬时转染并测试暴露于TNF-α时的存活能力。过表达
- 30 HO-1保护βTC3免于TNF-α介导的凋亡(Pileggi et al., *Diabetes* 50:1983-1991, 2001)(87%存活相对于对照组的33%存活)(图 2A)。当HO-1活性被锡原卟啉

IX (SnPPIX)阻断时(Kappas et al., Hepatology 4:336-341, 1994), 抗凋亡作用受抑制(图 2A), 说明抗凋亡功能需要产生至少一种经 HO-1 的血红素代谢终产物, 即铁, 胆红素和/或 CO。

5 基于 HO-1 抗凋亡作用可能由一氧化碳介导的假说, 检验是否暴露于外源一氧化碳会替代 HO-1 保护 $\beta$ -细胞免于凋亡。当用 SnPPIX 抑制 HO-1 的作用时, 一氧化碳暴露与 HO-1 同样程度地抑制了 TNF- $\alpha$ 介导的凋亡(图 2A)。用 DNA 的断裂分析证明, 单一暴露于外源一氧化碳是有保护作用的(11.7%凋亡细胞相对于未暴露于 CO 的对照组的 20.3%凋亡细胞)(图 2B)。相似地, 用鬼臼亚乙苷或血清剥夺诱导的 $\beta$ -细胞凋亡被一氧化碳暴露所抑制  
10 (图 2C)。

#### 在供体和受体内 HO-1 的诱导使胰岛移植物的存活延长

研究是否在供体和受体内 HO-1 的诱导会保护胰岛细胞移植物。利用下面的方法产生下面表 1 描述的数据。使用小鼠模型进行实验。在胰岛细胞分离前每天一次用钴原卟啉(CoPP)(20mg/Kg)给予胰岛细胞的供体。将胰岛  
15 细胞移植物的受体于第 1, 3, 5, 7 天每天一次用 CoPP(20mg/Kg)处理或者于第 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 和 17 天每天一次用 CoPP(10mg/Kg)处理。用 CoPP 处理诱导血红素氧合酶-1(HO-1)的表达。

表 I

在供体和受体内 HO-1 的诱导使胰岛移植物的存活延长

处理	胰岛数	排斥天数	均值 $\pm$ 标准差	排斥/总数
CoPP20mg/Kg $\times$ 5	350-400	17,33,33,48, >58 $\times$ 2,>67 $\times$ 1	44.85 $\pm$ 17.81	4/7
CoPP10mg/Kg $\times$ 10	350-400	30,30, >51 $\times$ 2,	40.5 $\pm$ 12.12	2/4
对照	350-400	8,8,15,15,16,22,26	15.71 $\pm$ 6.65	7/7

20 列在“排斥天数”下面的是胰岛存活的天数。例如, “>51 $\times$ 2”意思是在 2 个受体内 51 天后胰岛仍存活。排斥的平均日期在第四列表示。这些数据证明 HO-1 的诱导导致移植后胰岛的存活延长。

#### 外源一氧化碳保护鼠胰岛细胞免于凋亡

25 本发明也研究了是否外源一氧化碳能保护小鼠胰岛细胞免于凋亡(图 3)。利用下面的方法产生图 3 描述的数据。在新鲜分离的小鼠胰岛(C57BL/6)上用 TNF- $\alpha$ 和环己酰亚胺(CHX)刺激诱导凋亡。刺激后直接将胰岛暴露于外

源一氧化碳 24 小时。将对照的胰岛用同样的方式处理但是不暴露于一氧化碳。48 小时后在 FACScan™ 上分析细胞的 DNA 断裂。此实验进行 2 次得到一致的结果。

如 DNA 断裂分析所测定的, 暴露于一氧化碳 24 小时可保护分离的小鼠(C57BL/6)朗格汉岛免于 TNF- $\alpha$ 加环己酰亚胺(CHX)介导的凋亡(11.7%凋亡细胞相对于未暴露于 CO 的对照的 20.3%凋亡细胞)(图 3)。

**外源一氧化碳的抗凋亡作用由鸟苷酸环化酶的活化和通过 cGMP-依赖的蛋白激酶(cGK)的信号介导**

研究外源一氧化碳的抗凋亡作用是否通过可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)活化和 cGMP 产生发挥作用的(图 4A-C)。利用下面的方法产生图 4A-C 描述的数据。图 4A: 外源一氧化碳的抗凋亡作用由鸟苷酸环化酶活化所介导。将  $\beta$ TC3 用  $\beta$ -半乳糖表达载体转染并暴露于外源一氧化碳(1%)。如所示, 将  $\beta$ TC3 用鸟苷酸环化酶抑制剂 ODQ 处理。图 4B: cGMP 类似物可以取代外源一氧化碳保护细胞免于凋亡。将  $\beta$ TC3 用  $\beta$ -半乳糖表达载体转染。如所示, 将  $\beta$ TC3 暴露于外源一氧化碳。如所示, 将  $\beta$ TC3 用 cGMP 类似物 8-Br-cGMP 处理但不暴露于外源一氧化碳。图 4C: cGMP-依赖性蛋白激酶(cGK)介导一氧化碳的抗凋亡作用。将  $\beta$ TC3 细胞用  $\beta$ -半乳糖表达载体共转染。如所示, 将  $\beta$ TC3 暴露于外源一氧化碳。如所示, 将细胞用蛋白激酶 G 抑制剂 KT5823(KT)处理。灰色柱代表未处理的  $\beta$ -细胞, 黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 处理的  $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示, 其是从 3 个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。

研究一氧化碳的抗凋亡作用是否是通过可溶性鸟苷酸环化酶活化和 cGMP 产生(如在成纤维细胞中描述的)发挥作用的(Petrache et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 278:L312-319, 2000)。用 ODQ 抑制 sGC 活性则抑制 CO 的抗凋亡作用, 说明在此实验系统中可溶性鸟苷酸环化酶是主要的一氧化碳介导体(图 4A)。cGK 激活剂/cGMP 类似物, 8-Br-cGMP 抑制  $\beta$ TC3 凋亡, 其抑制程度与用一氧化碳所得到的相似(图 4B)。而且, 用特异的抑制剂 KT5823 抑制 cGMP-依赖的蛋白激酶则抑制了外源一氧化碳的抗凋亡作用(图 4C), 显示一氧化碳的抗凋亡作用通过一个或几个 cGMP-依赖的蛋白激酶活化所介导。

**在各种方案中外源一氧化碳提供抗凋亡保护**



研究诱导凋亡后一氧化碳保护 $\beta$ 细胞的能力(图 5A-C)。利用下面的方法产生图 5A-C 描述的数据。图 5A: 暴露于一氧化碳 1 小时足以防止凋亡。将 $\beta$ TC3 用 $\beta$ -半乳糖表达载体转染。用 TNF- $\alpha$ 诱导 $\beta$ 细胞凋亡。TNF- $\alpha$ 活化后马上将细胞暴露于 1%一氧化碳不同时间(0-24 小时)。对照的 $\beta$ TC3 用同样的方式处理但不暴露于一氧化碳。给予 TNF- $\alpha$  24 小时后测定细胞存活。图 5B: 诱导凋亡后一氧化碳保护 $\beta$ -细胞。将 $\beta$ TC3 用 $\beta$ -半乳糖表达载体转染。用 TNF- $\alpha$ 诱导 $\beta$ 细胞凋亡。不同时间后(如所示, 0.5-12 小时), 将 $\beta$ TC3 暴露于 1%一氧化碳(Otterbein et al., Nat. Med, 6:422-428, 2000)。对照的 $\beta$ TC3 同样处理但不暴露于一氧化碳。应用 TNF- $\alpha$  24 小时后测定细胞存活。图 5C: 用一氧化碳预温育防止 $\beta$ 细胞凋亡。用 $\beta$ -gal 表示载体转染 $\beta$ TC3 并用 TNF- $\alpha$  诱导凋亡。将 $\beta$ TC3 预暴露于 1%一氧化碳 1 小时。对照的 $\beta$ TC3 用同样的方式处理但不暴露与一氧化碳。终止预暴露 1-6 小时后用 TNF- $\alpha$ 诱导凋亡。灰色柱代表未处理的 $\beta$ -细胞, 黑色柱代表用 TNF- $\alpha$ 处理的 $\beta$ -细胞。结果用均值 $\pm$ 标准差表示, 其是从 3 个实验中选出一个代表实验的二个平行孔得来的。

15 加入 TNF- $\alpha$ 后立即将 $\beta$ TC3 暴露于一氧化碳不同时间(1-24 小时)并在 24 小时后测定凋亡。暴露于一氧化碳 1 小时足以防止凋亡(图 5A)。

为研究一氧化碳暴露是否可以阻断凋亡的发生, 在用 TNF- $\alpha$ 诱导凋亡 0.5-12 小时后将 $\beta$ -细胞暴露于 CO 1 小时。甚至在 TNF- $\alpha$ 刺激后 2 小时暴露, 一氧化碳仍能抑制 $\beta$ -细胞凋亡(图 5B)。

20 为研究用一氧化碳预保温是否会保护 $\beta$ 细胞免于凋亡, 在诱导凋亡前将 $\beta$ TC3 暴露于一氧化碳 0.5-3 小时。一氧化碳存在时预保温 1 小时足以防止 $\beta$ 细胞凋亡(数据未显示)。为评价当预保温和凋亡刺激之间的时间延长时此作用可持续多长时间, 在用 TNF- $\alpha$ 诱导凋亡前 1-6 小时将 $\beta$ 细胞预暴露于 CO 1 小时(图 5C)。用一氧化碳预保温 1 小时可防止用 TNF- $\alpha$ 刺激的 $\beta$ 细胞凋亡, 甚至在一氧化碳处理 1 小时结束后 2-3 小时。这些数据显示用一氧化碳进行相对短时间的处理可以产生抗凋亡作用并且这种抗凋亡作用可以持续一段时间。

#### 小鼠胰岛暴露于一氧化碳改善移植后胰岛的存活/功能

30 为判断一氧化碳是否也能改善体内胰岛移植植物功能, 将 250 个人工摘取的边缘量胰岛(marginal islet mass)在同源系统原发无功能模型中移植 (Berney et al., Transplantation 71:125-32, 2001; Kaufman et al., Diabetes

43:778-83, 1994)。将边缘(例如, 低于最佳的)数量(“边缘量”)的胰岛移植给糖尿病的同源受体引起向正常血糖水平恢复的延缓而无排斥反应或自身免疫疾病的复发。在判断在 C57BL/6 同源系统中胰岛边缘量是什么时, 观察到在受体肾包囊下移植 500 个人工摘取的胰岛导致快速恢复正常血糖水平  
5 (1.5±0.5 天(n=4)), 而移植 250 个胰岛导致明显延缓(14.2±2.94 天(n=9))。因此, 将 250 个胰岛定义为边缘量。以此方式使用边缘量不涉及排斥或自身免疫疾病的复发(Berney et al., Transplantation 71:125-132, 2000)。

研究移植前胰岛移植物用一氧化碳预保温是否可导致体内功能的更好发挥(图 6A-B)。利用下面的方法产生图 6A-B 描述的数据。图 6A: 将从  
10 C57BL/6 小鼠新鲜分离并人工摘取的 250 个胰岛在用 1%一氧化碳预饱和的培养基中于 37°C 保温 2 小时, 对照的胰岛按同样方式处理但不暴露于一氧化碳。如前所述将胰岛移植在糖尿病同源受体的肾包囊下。移植后, 每天测定血糖水平。总计 16 个动物进行了移植(8 个预暴露的; 8 个对照的)。一个接受预暴露的动物在 3 天时死于与暴露无关的技术原因并将其作为受试  
15 的动物包括在统计分析中。这些实验的最初终点是血糖水平正常的第一天。数据表示为均值±标准差。图 6B: 显示接受了事先暴露于一氧化碳的胰岛或对照胰岛的动物恢复的概率(血糖水平低于 200mg/dl)。\* 与对照相比  $P = 0.001$ 。

基于如下观察, 即一氧化碳处理的作用会持续延长的时间(图 5A 和 B)  
20 并且用一氧化碳相对短的预处理(在使用凋亡刺激前)是抗凋亡的(图 5C), 评价胰岛预暴露于一氧化碳是否能改善移植后胰岛的存活和/或功能。将边缘量胰岛移植在糖尿病同源受体的肾包囊下。与未预暴露于一氧化碳的对照胰岛达到正常血糖水平所需时间(14 天 95%可信区间: 12-18 天)相比, 当胰岛在用一氧化碳预饱和的培养基中预温育 2 小时时达到正常血糖水平所需  
25 时间(7 天, 95%可信区间: 6-8 天)非常明显地( $P=0.0011$ )缩短(图 6)。总计, 这些实验使用了三个不同的胰岛制备物。在这三个胰岛制备物间达到正常血糖水平的时间没有明显的统计学差异( $P>0.25$ )。

### 一氧化碳暴露

对于细胞培养实验, 为缓冲需要应用 5%CO<sub>2</sub>。在向暴露室内运送前在  
30 不锈钢混合筒内, 将在压缩空气中浓度 1%(百万分之 10,000)的 CO 与有或没有 CO<sub>2</sub> 的压缩空气混合。进入 3.70 平方英尺树脂玻璃动物室的流速维持

在 12L/min, 进入 1.2 平方英尺的细胞培养箱的流速维持在 2L/min。使细胞培养箱湿润并维持在 37°C。使用 CO 分析仪(Interscan, Chatsworth, CA)连续测定箱内 CO 水平。分析仪通过箱顶部口以 1L/min 速率采取气体样品进行电化学检测分析, 灵敏度为 10-600ppm。每小时测定浓度水平。一旦箱内已经平衡(大约 5 分钟)则 CO 浓度没有波动。

在 3.7 立方英尺的玻璃暴露室内以 12L/min 的流速将动物暴露于 >98%O<sub>2</sub> 或 98%O<sub>2</sub> + CO 混合物。在暴露过程中给予动物食物和水。在向暴露室内运送前在不锈钢混合筒内, 将在压缩空气中浓度 1%(百万分之 10,000)的 CO 与 >98%O<sub>2</sub> 混合。通过改变进入混合筒的 CO 的流速, 控制向暴露室释放的浓度。因为用 O<sub>2</sub> 流速最初判断流速, 所以只改变 CO 流速即可产生向暴露室释放的不同浓度。用气体分光计测定所述室内 O<sub>2</sub> 的浓度。

### 细胞分离步骤

下面的实施例描述用于大鼠或小鼠胰岛细胞分离的方法。将一瓶 Rat Liberase™ (购自 Boehringer Mannheim/Roche 货号 1 815 032)溶解在 4ml 无菌 HBSS 中, 冰上制冷 30 分钟, 分装成 0.5ml 的等份, 贮存于 -20°C。对每 0.5ml 等份, 加入 33ml 无小牛血清的培养基, 例如, M199, HBSS 或 RPMI 1640。

将大鼠过量麻醉(.1ml 加 .1ml/100g 体重戊巴比妥钠腹腔注射)。对小鼠, 准备带有弯成 90 度角的 27g 针头并装有 2ml Liberase™ 溶液的 3ml 注射器。外科手术使用的是 2 对剪刀; 一对大的用来剪开腹部, 一对小的用于剪断胆管。使用 2 对镊子切开胰腺。一个止血钳用于夹紧胆管。

从下腹部作 v 型切口打开腹腔并尽可能暴露胰腺。在胰导管的十二指肠入口处将其夹紧(大鼠用止血钳或者小鼠用小牛角(bulldog)钳), 小心不要损伤周围胰腺组织。在近端分离胆管。插入导管前去除脂肪, 确保未刺破门静脉。用小剪刀横着剪开三分之一胆管并向其中插入导管。用镊子轻轻夹住胆管使导管保持在管中。快速注入 Liberase™ 溶液。注射 6ml 液体后胰腺呈现出扩大并充分膨胀。在小鼠, 将针头尽可能接近肝脏地插入所述导管中并注入 Liberase™ 溶液。然后切开横隔膜和心脏或主动脉将大鼠或小鼠处死。

Liberase™ 渗透后, 先从小肠, 然后从胃和脾脏剥离切下胰腺。当胰腺仅附着胆管时, 将其从大鼠上切下。将胰腺放于 50ml 锥形管中, 并放在 37°C 水浴中 30 分钟。

- 保温后,每管中加入 20ml 的培养基加 NCS。将分离的剩余物完全置于冰上。用手用力震摇管子 5 - 10 秒以打碎组织。在临床离心机上以 800rpm(大约 180×g)离心 120 秒或 1200rpm(大约 200×g)离心 90 秒将胰岛洗涤几次以去除 Liberase™。倒出上清并加入 25-35ml 培养基轻轻涡旋(大约最大值的 1/2)。
- 5 重复离心步骤,随后洗涤 2-3 次。将组织在 20ml 培养基中重悬,并且将悬液用 400μm 直径金属网(Thomas scientific mesh35 货号 8321-M22)过滤以去除残留的未消化的组织,脂肪和淋巴。再向管中加入 5-10ml 以洗涤下任何残留的胰岛并通过网过滤。
- 于 1200rpm 离心 90 秒将细胞沉淀。弃去上清,尽量少留培养基。
- 10 为形成梯度,将沉淀重悬在 10-15ml Histopaque 1077™ (Sigma 货号 H1077)并涡旋直至悬液均匀(同洗涤)。覆盖上 10ml 无 NCS 培养基,小心维持 Histopaque™ 和培养基之间的明显界面。沿管边用吸管慢慢加入培养基。将所述梯度在 10℃,以 2400rpm(900g)离心 20 分钟,离心时要非常缓慢地加速且不用刹车。
- 15 离心后,用可任意使用的 10cc 血清吸管(Falcon)从交界处收集胰岛层,并放于 50cc 锥形管中。加入 25-35ml 加 NCS 的培养基将胰岛洗涤几次以去除 Histopaque™。起初离心在 1200rpm 持续 2 分钟,但随后的离心进行 90 秒。3 次洗涤后,通过吹吸将胰岛重悬。为便于手工挑取,将每 7-10ml 放于 60mm 无菌培养皿中。
- 20 在显微镜下,用 100μl 无菌吸头进行胰岛细胞的手工挑取。每次取一个胰岛,并小心避免所有其他组织。只摘取直径 50-225μm 的呈光滑的且圆或卵圆型的胰岛。

## 实施例 II 一氧化碳抑制小鼠向大鼠移植心脏的排斥

### 25 动物

用 BALB/c 小鼠心脏作为移植入近交的成年雄性 Lewis 大鼠(Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) 的供体器官。将动物按照美国实验室动物管理协会规则饲养,且研究方案经过 Beth Israel Deaconess Medical Center 的 Institutional Animal Care and Use Committee 允许。

### 30 外科模型

在所有操作中将动物用甲氧氟烷(Pitman-Moore, Mundelain, IL)吸入和

戊巴比妥(Abbott, North Chicago, IL)30-50mg/kg 腹腔注射联合麻醉。如以前所述进行异位心脏移植(Berk et al., *Physiol Rev.* 8:999-1030, 2001; Petkova et al., *J Biol. Chem.* 276:7932-7936, 2001)。通过触诊每天评价移植物的存活。通过心室收缩停止诊断排斥并通过组织学检查确认。

## 5 实验试剂

按照移植当天为第 0 天而论, 在第 1 天(60U/kg)和第 0 天(20U/kg)腹腔注射给予眼镜蛇毒因子(CVF; 其阻断补体激活)(Quidel, San Diego, CA)。将阻断 T 细胞激活的环孢菌素 A(CsA; Novartis, Basel, Switzerland), 在第 0 天开始肌注给药(15mg/kg), 并且此后每天给药直至每个试验结束。将锡原卟啉(SnPPIX), 钴原卟啉(CoP-PIX), 和铁原卟啉(FePPIX; Porphyrin Products, Logan, UT)用 100mM NaOH 稀释成 50mM 的贮存液并在 -70℃ 保存直至使用。尽可能避光。将 SnPPIX 和 FePPIX 在 PBS 中腹腔注射给药(30μM/kg)。在移植前 2 天和前 1 天向供体给予 FePPIX 和 SnPPIX(30μM/kg), 在移植时(第 0 天)和此后每天向受体给予 FePPIX 和 SnPPIX(30μM/kg)。

## 15 CO 暴露

简言之, 在向暴露室内释放前在不锈钢混合筒内, 将在压缩空气中浓度 1%(百万分之 10,000; ppm)的 CO 与平衡空气(21%O<sub>2</sub>)混合。在向暴露室释放前通过改变进入混合筒的 CO 的流速, 控制 CO 浓度。因为用 O<sub>2</sub> 流速最初判断流速, 所以只改变 CO 流速即可改变向暴露室释放的终浓度。用 CO 分析仪(Interscan, Chatsworth, CA)连续测定所述室内 CO 水平。在移植前 2 天将移植体供体放于 CO 暴露室中。移植后立即将移植体受体放于暴露室中并在暴露室中保持 14(n=3)或 16 天(n=3)。所有时间里将 CO 浓度维持在 250 和 400ppm 之间。每天从所述室中取出动物, 按照上述评价移植体存活并给予 CsA, SnPPIX, 或 FePPIX。

## 25 HO 酶活性

用心脏和肝脏微粒体中胆红素的产生测定 HO 酶活性。将动物处死, 将肝脏和心脏用冰冷的 PBS 灌注并冻于 -70℃ 直至使用。将器官用 4 倍体积蔗糖 (250mM)Tris-HCl(10mM/L) 缓冲液 (pH7.4) 在冰上匀浆并离心 (28,000RPM 3X, 20 分钟, 4℃)。将上清离心 (105,000RPM 3X, 60 分钟, 4℃), 并将微粒体沉淀在 MgCl<sub>2</sub>(2mM)-磷酸钾(100mM)缓冲液 (pH7.4) 中重悬并在冰上超声。将样品(1mg 蛋白质)加入含有大鼠肝脏细胞溶胶(2mg 蛋白质),

氯高铁血红蛋白(50 $\mu$ M), 6-磷酸-葡萄糖(2mM), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(0.25U), 和 NADPH(0.8mM)的反应混合物(400 $\mu$ l)中在黑暗中于 37 $^{\circ}$ C 保持 60 分钟。将形成的胆红素用氯仿提取, 并在 464-530nm 测定 OD 值(消光系数, 胆红素为 40mM/cm)。将酶活性表达为每 60 分钟每毫克蛋白质形成的胆红素的 pmol 数(pmol/mg/h)。用双金鸡纳酸蛋白质测定(Pierce, Georgetown)判断蛋白质浓度。背景是 ~5pmol/mg/h。除非另有说明, 此测定中使用的所有试剂购自 Sigma(St. Louis, MO)。移植后 2 天用 Corning 865 血气分析仪(Clinical Chemistry, Massachusetts General Hospital, Boston, MA)测定碳氧血红蛋白。

### 组织形态测量分析

10 移植 3 天后收获移植物, 用石蜡包埋, 福尔马林固定, 并从尖部到底部全部作连续切片(5 $\mu$ m)。将每张载玻片上放 10 张切片, 共计约 20-25 张载玻片。将每第五张载玻片用苏木精和伊红(H&E)染色作组织形态测量分析。用尼康 Eclipse E600O 显微镜(Nikon, Melville, NY)在每个载玻片上获取 2 幅图像, 该显微镜连接于日立 3-CCD 彩色照相机(model HV-C20; Hitachi, 15 Tokyo, Japan)和装有 IPLab Spectrum 数码图像软件(Signal Analytics Corporation, Vienna, VA)的 Power MacintoshO 7300/200 计算机(Apple Computer, Cupertino, CA)。从每组 2-3 个动物的每个移植的心脏获取大约 50 幅图像。将图像用人工断层(segmentation)分析, 在每个切片上描记右心室和左心室梗死的和未梗死的区域。用数码图像软件计算对应于梗死的和未梗死的组织的面积, 所述面积以对应于这些面积的像素来计算。然后计算梗死的和未梗死的面积占总面积的百分比。汇总每组数据, 表示为像素区域或梗死的百分比, 用 ANOVA 分析。用这种方式获得的结果无论使用像素还是使用梗死的百分比是相似的, 因此仅显示了用梗死百分比获得的结果(见表 II)。结果表示为均值 $\pm$ 标准差。

### 25 免疫组织学

移植后 3 天收获移植物, 在液氮中快速冷冻, 并贮存于-80 $^{\circ}$ C。将冷冻切片按照以前描述的(Soares et al., Nature Med. 4:1073, 1998) 固定并染色。大鼠白细胞群的分析使用抗大鼠白细胞共同抗原(LCA, CD45; OX-1),  $\alpha\beta$  TCR(TCR $\alpha\beta$ -链; R73), B 细胞(CD45RB; OX-33), NK 细胞(NKR-P1; 3.2.3), 30 和 M $\Phi$ (CD68; ED-1)的单克隆抗体(Serotec, Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN)。用兔抗人纤维蛋白/纤维蛋白原多克隆抗体(Dako,

Carpinteria, CA)进行纤维蛋白/纤维蛋白原的检测。用抗大鼠 C1-q(The Binding Site, Birmigham, U.K.), C3(ED11; Serotec), 或 C5b-9 单克隆抗体(Dako)检测移植物内的补体活化。用小鼠抗大鼠 IgM 单克隆抗体 MARM-4(比利时布鲁塞尔, Louvain 大学 H. Bazin 博士惠赠)检测大鼠 IgM。

5 每个实验包括同种型匹配的单克隆抗体或纯化的免疫球蛋白, 以及残留的内源性过氧化物酶活性的对照。按照生产商的说明用 ApopTag™ 原位凋亡检测试剂盒(Oncor, Gaithersburg, MD)进行凋亡的检测。

#### 补体溶血测定(CH50)

10 将 CH50 单位定义为需要产生抗体敏感的绵羊红细胞 50%最大裂解的大鼠血清的稀释度。简言之, 将抗体敏感的绵羊红细胞( $1 \times 10^8$  细胞/ml; Sigma)与明胶 Veronal 缓冲液(GVB<sup>++</sup>; Sigma)中的大鼠血清保温(30 分钟, 37°C)。将细胞离心并测定血红蛋白释放( $\lambda=550\text{nm}$ )。在无绵羊红细胞或无血清时测定背景并从所有标本上减去。

#### 细胞 ELISA

15 用细胞基础上的间接 ELISA 测定大鼠抗小鼠抗体的血清水平。将小鼠 2F-2B 内皮细胞系(CRL-2168; 美国典型培养中心(ATCC), Manassas, VA)作为抗原靶。简言之, 将 2F-2B 细胞培养在 DMEM(Life Technologies, Rockville, MD), 10%FCS, 100U/ml 青霉素, 和 100 $\mu\text{g/ml}$  链霉素中(Life Technologies)。

20 将戊二醛固定的 2F-2B 细胞在用含 0.05%Tween20(Sigma)的 PBS 系列稀释的大鼠血清存在下保温(1 小时, 37°C), 并检测大鼠抗小鼠抗体, 所使用的是小鼠抗大鼠 IgM(MARM-4), IgG1(MARG1-2), IgG2a(MARG2a-1), IgG2b(MARGb-8), 或 IgG2c(MARG2c-5) (比利时布鲁塞尔, Louvain 大学 H. Bazin 博士惠赠)。用辣根过氧化物酶(HRP)标记的消除了抗大鼠 Ig 交叉反应的的山羊抗小鼠 Fab'(0.1 $\mu\text{g/ml}$ , 1 小时, 室温; Pierce, Rockford, IL)检测

25 小鼠抗大鼠抗体。用枸橼酸盐缓冲液(pH4.9)中的邻苯二胺(Sigma)和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.03%)使 HRP 显色。在  $\lambda = 490\text{nm}$  处测定吸光度。血清中循环性抗移植物抗体的相对量表示为取自测定的线性范围中一系列稀释度(1:32-1:1024)的 OD 值( $\lambda=490$ )。

30 大鼠 C3 与小鼠内皮细胞的结合用小鼠 2F-2B 内皮细胞作为抗原靶的改良的细胞 ELISA 测定(Miyatake et al., J. Immunol. 160:4114, 1998)。简言之, 将未固定的 2F-2B 细胞在用 GVB<sup>++</sup>缓冲液系列稀释的大鼠血清存在下保温

(1 小时, 37°C)。将细胞在 0.05%戊二醛的 PBS 中固定, 用小鼠抗大鼠 C3 单克隆抗体(Serotec)检测大鼠 C3 的沉积。

#### 血小板聚集测定

将小鼠 2F-2B 内皮细胞培养在 0.2%明胶(Sigma)包被的 6 孔板上, 该板  
5 加有 88%DMEM(Life Technologies, Rockville, MD), 10%FCS(FCS), 100U/ml 青霉素, 和 100 $\mu$ g/ml 链霉素(Life Technologies)。将汇合的内皮细胞或者不作处理或者用下列物质处理: HO 诱导剂 CoPPIX(50 $\mu$ M; 18 小时), HO 抑制剂 SnPPIX(50 $\mu$ M; 18 小时), 或者既用 CoPPIX(50 $\mu$ M; 15 小时)又用 SnPPIX(50 $\mu$ M; 3 小时)。将在 3.8%枸橼酸钠中的正常大鼠血浆离心(290g,  
10 12 分钟, 19°C)获得富含血小板的血浆。将大鼠血小板(3-10<sup>8</sup> 细胞/ml)在 HT 缓冲液(8.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM 葡萄糖, 2.8 mM KCl 溶液, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 129 mM NaCl, 10 mM HEPES)中重悬。将血小板覆盖在小鼠内皮细胞上(5 分钟; 37°C), 使用聚集测定仪(aggregometer)(Chrono-Log, Harestown, PA)且 ADP (0.5-4 $\mu$ M)作激动剂按照以前描述(Kaczmarek et al, J.  
15 Biol. Chem. 271: 33116, 1996)进行血小板聚集测定。

#### 细胞提取和 Western 印迹分析

将内皮细胞用 PBS(pH7.2)洗涤, 刮取收集, 并在 Laemmli 缓冲液中裂解。在变性条件下用 10%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。用电印迹将蛋白质转移至聚二氟乙烯(polgvinyl difluoridine)膜(Immobilon P; Millipore, Bedford,  
20 MA)上并用抗人 HO-1 或 HO-2(StressGen, Victoria, Canada)或  $\beta$ -微管蛋白(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)的兔多克隆抗体检测。用 HRP 偶联的驴抗兔 IgG 或山羊抗小鼠 IgG(Pierce)使蛋白质显影并且按照生产商的说明进行 ECL 测定(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)。

#### 瞬时转染和凋亡测定

按照别处描述的(Soares et al., Nature Med. 4: 1073,1998; Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015, 2000)将小鼠 2F-2B 内皮细胞系(ATCC)瞬时转染。所有实验在转染 24-48 小时后进行。按别处描述的(Soares et al., Nature Med. 4: 1073,1998; Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015, 2000)检测  $\beta$ -半乳糖苷酶转染的细胞。按别处描述的(Soares et al., Nature Med. 4: 1073,1998; Brouard et al.,  
30 J. Exp. Med. 192: 1015, 2000)通过评价保持正常形态的表达  $\beta$ -半乳糖苷酶细胞的数量估计活细胞百分比。确定计数的随机视野数使每对照孔最少有 200



个活的转染的细胞。用无凋亡诱导剂存在时计数的转染细胞数(100%存活)校正每个 DNA 制备物的活细胞百分比。所有实验做平行两份并至少进行 3 次。将放线菌素 D (Act. D; Sigma)溶解在 PBS 中并在转染后 24 小时加入培养基中(10 $\mu$ g/ml)。将 SnPPIX (卟啉产物)(10 $\mu$ M)溶解于 100mM NaOH 中并保存于-20 $^{\circ}$ C 直至使用。将 SnPPIX 在转染后 6 小时加入培养基(50 $\mu$ M)。人重组 TNF- $\alpha$ (R&D systems, Minneapolis, MN)溶解于含 1%牛血清白蛋白的 PBS 中并在转染后 24 小时加入培养基中(10-100ng/ml)。

### 5 培养的内皮细胞暴露于 CO

如别处所述(Otterbein et al., Nature Med. 6: 422,2000; 和 Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015,2000)将细胞暴露于压缩的空气或不同浓度的 CO(250 和 10,000 ppm)。

### 主动脉移植模型

如别处所述(Plissonnier et al., Transplantation 60: 414-424,1995)进行主动脉移植。简言之,肝素化后将主动脉和下腔静脉切至出血。在另外的左侧胸廓切开术后,用 7-0 尼龙缝合线(Keisei Medical Industrial Co., LTD, Tokyo, Japan)将 3 或 4 对肋间动脉结扎,并获取 2cm 降主动脉。用标准的显微外科技术使用 9-0 尼龙缝合线(Ethilon<sup>TM</sup>, Ethicon, Inc, Somerville, New Jersey)将移植物插入肾动脉和主动脉分支处之间。在两侧边缘结扎后留下天然的腹主动脉。

20 如前所述 (Otterbein et al., Am J Physiol 276 (4 Pt1) : L688-L694,1999)将在压缩空气中浓度 1%(百万分之 10,000; ppm)的 CO 与平衡的空气(21 % oxygen)混合。对于移植模型,在移植前 2 天,将移植物供体放在 CO 室内。移植后立即将受体放在所述室内并保持 56 天。全部时间里将 CO 浓度维持在 250ppm。

25 将成年雄性(250-350g)Brown Norway 大鼠(RT1)用作主动脉移植物供体而将成年雄性(250-350g)Lewis 大鼠(RT1)作为受体(Charles River Lab. Wilmington, MA)。雄性 C57BL/6, p21<sup>-/-</sup>和 p53<sup>-/-</sup>裸鼠购自 Jackson 实验室(Bar Harbor, ME)。MKK3 (-/-)裸鼠按照以前描述的生产(Lu et al., EMBO. J. 18: 1845-1857,1999)。给予随意的鼠料和水允许小鼠适应水土一周。

### 30 RT-PCR

用 RNA 提取试剂盒(Qiagen, Chatsworth, CA), 按照生产商的说明从移

植的心脏分离 RNA 后进行 RT-PCR。用于小鼠 $\beta$ -肌动蛋白的引物是：正义(5'-3'), CCTGACCGAGCGTGGCTACAGC (SEQ ID NO :1) ; 反义(3'-5'), AGCCTCCAGGGCATCGGAC (SEQ ID NO : 2); 和用于小鼠 HO-1: 正义(5'-3'), TCCCAGACACCGCTCCTCCAG (SEQ ED NO : 3); 反义(3'-5'),  
5 GGATTTGGGGCTGCTGGTTTC (SEQ ID NO : 4)。

#### 酶活性对抑制急性血管排斥是重要的

移植入未处理的大鼠的小鼠心脏在移植后 2-3 天发生急性血管排斥, 此观察与以前的报道(Soares et al., Nature Med. 4: 1073,1998; and Koyamada et al., Transplantation 65: 1210,1998)一致。用眼镜蛇毒因子(CVF)加环孢菌素 A (CsA)处理, 小鼠心脏移植存活时间长(见下面表 II), 此发现也与以前的报道一致。在 CVF 加 CsA 处理下, 移植物的存活与移植物内皮和平滑肌细胞以及心肌细胞的 HO-1 表达上调有关(图 7)。移植后 12-24 小时用 RT-PCR 检测 HO-1mRNA 的表达和移植后 24-72 小时检测 HO-1 蛋白质(图 7)。当向供体然后向受体给予 HO 抑制剂 SnPPIX 时, 尽管用 CVF 加 CsA 处理也不产生移植物的长期存活。在这些条件下, 所有移植物在 3-7 天被排斥(表 II)。用不抑制 HO 活性的原卟啉 FePPIX 对照处理, 不导致移植排斥(表 II)。

表 II

SnPPIX 对 HO-1 活性的抑制促进移植排斥

处理	存活时间
CVF + CsA	>50(n=8)
CVF + CsA + FePPIX	>50(n=4)
CVF + CsA + SnPPIX	3, 4, 5(n=2); 6(n=4); 7(n=2)

为产生表 II 的数据, 将小鼠心脏移植入 CVF 加 CsA 处理的大鼠。将移植受体用 FePPIX 或 SnPPIX 处理。用 SnPPIX 处理在移植后 3-7 天诱导移植排斥(与单一用 CVF 加 CsA 处理或 CVF 加 CsA 加 FePPIX 处理的大鼠对比,  $p < 0.0001$ )。用菲舍尔氏精确检验(Fisher's exact test)进行统计学分析。

为证明是 SnPPIX 而不是 FePPIX 阻断体内 HO-1 的功能, 在移植后 2 天将移植的和受体心脏的总 HO 酶活性定量(图 8)。天然小鼠心脏每小时每毫克总蛋白质产生  $35.5 \pm 4$  pmol 的胆红素 (pmol/mg/h; 图 8)。与天然心脏相比, 在移植给下列情况的大鼠的心脏中 HO 活性明显增加: 未处理的( $98 \pm 7.21$

pmol/mg/h ;  $p = 0.001$ ), CVF 加 CsA 处理的( $98.3 \pm 7.23$  pmol/mg/h), 或 CVF 加 CsA 加 FePPIX 处理的( $77.3 \pm 5.51$  pmol/mg/h ;  $p = 0.0009$ )(图 8)。在移植给用 CVF 加 CsA 加 SnPPIX 处理的( $32.37 \pm 7.23$  pmol/mg/h)大鼠的小鼠心脏中, HO 活性被抑制至同天然心脏中一样的基础水平。这表示同移植给未处理的

5 (  $p = 0.0009$ ), CVF 加 CsA 处理的( $p = 0.0009$ ), 或 CVF 加 CsA 加 FePPIX 处理的大鼠( $p = 0.0018$ ; 图 8)的小鼠心脏相比有非常明显的抑制作用。移植后受体肝脏内的 HO 活性也以与移植的心脏相似的方式上调(数据未显示)。但是, 在受体自己的心脏上不是这种情况, 其 HO 活性在移植后不上调(图 8)。在移植给 SnPPIX 处理的大鼠的移植物中, 有进展性的心肌梗死, 其早至移

10 植后 2 天即开始明显(数据未显示)。这在移植给用 FePPIX 处理的对照大鼠的移植物中未观察到(数据未显示)。

以前已经显示接受小鼠心脏移植的大鼠在 CVF 加 CsA 处理下产生的抗小鼠抗体全部是 IgM 同种型(Koyamada et al., Transplantation 65: 1210, 1998)。另外用 SnPPIX 或 FePPIX 处理不影响此抗体应答(图 9)。如在小鼠内皮细胞上 C3 沉积所证明的, 抗移植物抗体的产生与补体的激活有关

15 (图 9)。SnPPIX 或 FePPIX 处理都不影响小鼠内皮细胞上 C3 沉积(图 9)。

#### 在抑制急性血管排斥中外源一氧化碳完全替代 HO-1 的酶活性

移植给用 SnPPIX 处理并暴露于 CO(400ppm; 0.04%)大鼠的所有小鼠心脏存活期长(见下面表 III)。使用的 CO 剂量(400-500ppm)相当于大约二十分之一致死剂量(数据未显示)。暴露于 CO 的大鼠和小鼠未出现不想要的反应。CO 暴露在移植后 14(n=3)或 16(n=3)天停止不影响移植物存活, 即, 移植物继续有功能 >50 天(表 III)。

20

表 III

在抑制移植排斥中外源一氧化碳完全替代 HO-1

处理	存活时间(天)
CVF + CsA + SnPPIX	3, 4, 5(n=2); 6(n=4); 7(n=2)
CVF + CsA + SnPPIX + CO	>50(n=6)

25 为生成表 III 的数据, 将小鼠心脏移植给 CVF 加 CsA 处理的大鼠。如所示, 将移植物受体用 SnPPIX 处理且进行或不进行 CO 暴露。在暴露于外源 CO 后在 SnPPIX 处理的大鼠中观察到的移植排斥被抑制(与用 CVF 加 CsA 加 SnPPIX 处理的受体对比  $p < 0.0001$ )。用菲舍尔氏精确检验进行统计

学分析。

为判定是否外源 CO 参与 SnPPIX 对 HO-1 酶活性的抑制,这可说明 CO 抑制移植物排斥的能力,研究是否 CO 影响移植给 SnPPIX 处理大鼠的心脏中 HO 的酶活性。如图 10 所示,事实并非如此。与移植给 SnPPIX 处理并暴露于 CO 的大鼠内的心脏的( $43.6 \pm 7.57$  pmol/mg/h;  $p = 0.1095$ ; 图 10)相比,移植给 SnPPIX 处理大鼠的心脏中总 HO 酶活性( $32.37 \pm 7.23$  pmol/mg/h)没有明显差别。在受体的肝脏和心脏也获得相似的结果(图 10)。

在防止移植物排斥中外源一氧化碳可以替代 HO-1 活性。可能的工作机制是其通过吸气参与将外源一氧化碳“载入”红细胞(RBC),然后通过循环以充足的浓度向移植物释放。按照此理论,当内源 HO-1 活性被 SnPPIX 抑制时,外源的一氧化碳会模拟在 HO-1 酶活性未受损害时产生的内源 CO 的作用。将移植受体暴露于 400ppm 的外源 CO 使碳氧血红蛋白增加从  $0.5 \pm 1.5\%$  至  $32.1 \pm 6.9\%$ (图 10)。在暴露于 CO 的动物中,甚至在 SnPPIX 抑制作用下移植的心脏存活的事实可以说明,此水平的 CO 足以充分“负荷”RBC,向移植物释放 CO,和抑制移植物排斥(图 10)。或者,一氧化碳可以溶解在血浆中向移植物,和所有全身组织释放。

研究是否外源 CO 抑制心肌梗死的发展,该梗死以在 SnPPIX 处理大鼠内的移植物排斥为特征。移植后 3 天收获移植物并定量梗死区的百分比。移植给未处理的大鼠的心脏显示近乎完全的右心室透壁性梗死(右心室面积的  $87.1 \pm 4.9\%$ )和左心室广泛的心内膜和透壁性梗死(左心室面积的  $32.0 \pm 6.7\%$ ; 数据未显示)。梗死表现为缺乏细胞核的无活力的嗜酸性心肌细胞和间质出血,水肿,和中性粒细胞。左心室梗死总是心内膜的梗死带有根据梗死程度的透壁性延伸,而右心室梗死是在其起源方面更弥散。两心室梗死的面积百分比一般从心脏的尖部向底部增加。移植给 CVF 加 CsA 处理的大鼠的心脏显示在右心室( $4.5 \pm 4.9\%$ )仅仅小的,弥散的,非透壁梗死区,但左心室无( $0.7 \pm 2.1\%$ )(见下面的表 IV)。移植给 CVF 加 CsA 加 FePPIX 处理的大鼠的心脏显示在右心室( $12.2 \pm 9.5\%$ )小的弥散的梗死区,但左心室无( $0.7 \pm 1.3\%$ )(表 IV)。这些心脏与移植给 CVF 加 CsA 无 FePPIX 处理的大鼠的心脏没有区别(数据未显示)。移植给 CVF 加 CsA 加 SnPPIX 处理的大鼠的心脏显示明显的透壁性右心室梗死( $26.1 \pm 12.7\%$ )及广泛的心内膜和透壁性左心室梗死( $37.6 \pm 15.5\%$ )(表 IV),这与移植给未处理大鼠的心脏的梗死类型

没区别(数据未显示)。这些损害是移植的心脏特有的。受体的天然心脏不  
 发生任何梗死。与移植给用 CVF 加 CsA 处理有或无 FePPIX 处理的大鼠的心  
 脏相比,移植给 SnPPIX 处理的大鼠的心脏的梗死面积百分比明显增高  
 (p<0.001)(表 IV)。移植给接受外源一氧化碳的 SnPPIX 处理的大鼠的心脏显  
 5 示右心室(8.4±5.3%)和左心室(1.8±3.4%)非常小的梗死,其类型与移植给用  
 CVF 加 CsA 处理有或无 FePPIX 处理的大鼠的心脏的相似(数据未显示)。移  
 植给接受外源一氧化碳的 SnPPIX 处理的大鼠的心脏梗死面积百分比明显  
 不同于移植给用 CVF 加 CsA 处理有或无 FePPIX 处理的大鼠的心脏。但是,  
 这些心脏的梗死面积百分比明显不同于移植给同样处理但不接受外源 CO  
 10 的心脏(p<0.001)。

表 IV  
 形态测量分析

处理	右心室	左心室
CVF + CsA	4.5±4.9	0.7±2.1
CVF + CsA + FePPIX	12.2±9.5	0.7±1.3
CVF + CsA + SnPPIX	26.1±12.7 *	37.6±15.5 *
CVF + CsA + SnPPIX + CO	8.4±5.3	1.8±3.4

为生成表 IV 的数据,将小鼠心脏移植(每组 n=3)给 CVF 加 CsA 处理的  
 大鼠。如所示,将移植物受体用 FePPIX 或 SnPPIX 处理且暴露于 CO。结  
 15 果表示为梗死面积的百分比。用 ANOVA 检验进行统计学分析。星号表示与  
 所有其它处理相比有显著性差异。

#### 外源一氧化碳抑制作为急性血管排斥特征的血管血栓形成和单核细胞/巨噬细胞浸润

将小鼠心脏移植给 CVF 加 CsA 处理的大鼠。给予 SnPPIX 或 FePPIX  
 20 并将移植物受体暴露于 CO(250-400ppm)。移植后 3 天收获移植物(每组 n=3)  
 并染色检查大鼠 IgM,大鼠和小鼠补体 C1q,大鼠和小鼠 P-选择素,大鼠  
 和小鼠纤维蛋白/纤维蛋白原,和 大鼠表达 CD45 的白细胞。移植给用 CVF  
 加 CsA 处理有或无 FePPIX 处理的大鼠的小鼠心脏显示广泛的血管内大鼠  
 25 IgM 和 C1q 沉积,但未检测到 IgG, C3, 或 C5b-9(数据未显示)。在移植物  
 内皮细胞和平滑肌细胞以及心肌细胞内检测到 HO-2, HO-1 和铁蛋白(数据  
 未显示)。仅有极少的血管血栓形成或宿主白细胞浸润,其通常与梗死灶区

有关(数据未显示)。在血管内皮细胞上有低的但可检测到的P选择素表达(数据未显示)。移植给CVF加CsA处理的大鼠的心脏,在用SnPPIX抑制HO-1活性时,显示出与对照的FePPIX处理的大鼠相似水平的血管内IgM和C1q沉积,并且未检测到IgG, C3, 或C5b-9(数据未显示)。大的冠状血管的广泛血管血栓形成与表达P选择素的血小板聚集和血管内纤维蛋白有关。在心脏底部大冠状血管一致地观察到血栓。在微血管内未检测到表达P选择素的血小板聚集(数据未显示)。移植物被宿主中性粒细胞以及表达单核细胞/MΦ标志CD68/ED-1和MHCII类抗原的CD45<sup>++</sup>白细胞广泛浸润(数据未显示)。单核细胞/MΦ浸润发现在小动脉附近和散在于所有心肌细胞,与梗死区有关。

移植给暴露于一氧化碳的SnPPIX处理的大鼠的心脏基本上与移植给用CVF加CsA处理有或无FePPIX处理的大鼠的心脏没有区别(数据未显示)。这些心脏显示出与移植给SnPPIX处理但没暴露于CO受体的心脏相似水平的血管内IgM和C1q沉积(数据未显示)。在CO暴露情况下,如缺乏能检测到的表达P选择素的血小板聚集或血管内纤维蛋白所显示的,没有血管血栓形成迹象。在移植物血管内皮细胞上检测到P选择素。有与小的灶性梗死区有关的一定水平单核细胞/MΦ浸润(数据未显示)。

#### 内皮细胞HO-1上调抑制血小板聚集

考虑到移植给暴露于CO大鼠的移植物内缺乏血小板聚集,研究是否内皮细胞HO-1表达会抑制体外血小板聚集。将小鼠内皮细胞暴露于CoPPIX或SnPPIX以分别诱导或抑制这些细胞内HO活性。将血小板覆盖在内皮细胞上并测定用ADP(2μM)刺激时它们的聚集能力。当用ADP刺激时覆盖在未处理的内皮细胞上的血小板聚集正常(图11)。当将血小板暴露于用SnPPIX预处理的内皮细胞时,与暴露于未处理的内皮细胞时相比血小板聚集被增强(图11)。此观察显示未处理的内皮细胞有基础水平的HO活性,推测其由于这些细胞组成性表达HO-2(图11)。当将血小板暴露于用CoPPIX预处理的内皮细胞时,与暴露于未处理或SnPPIX处理的内皮细胞时相比血小板聚集明显被抑制(图11)。当将血小板暴露于既用CoPPIX又用SnPPIX处理的内皮细胞时,这种抑制作用减轻(图11)。CoPPIX和SnPPIX都上调培养的内皮细胞HO-1表达(数据未显示)。这些原卟啉的不同作用应当归因于SnPPIX作为HO-1酶活性强抑制剂的能力。

### HO-1 产生抑制内皮细胞凋亡的 CO

作为移植给用 SnPPIX 处理的大鼠的小鼠心脏排斥特征的一个主要特点是广泛的内皮细胞和心肌细胞凋亡(图 12)。凋亡不发生在移植给用 FePPIX 处理的大鼠的小鼠心脏(图 12)。考虑到 HO-1 抑制体外内皮细胞凋亡的能力(Soares et al., Nature Med. 4,1073-1077,1998; 和 Brouard et al., J. Exp. Med. 192: 1015,2000), 研究是否这种细胞保护作用是经 CO 产生介导的。凋亡不发生在移植给用 SnPPIX 处理并暴露于 CO 的大鼠的小鼠心脏, 说明事实的确如此(图 12)。研究体外是否用 SnPPIX 抑制 HO-1 活性情况下, 外源 CO 会防止内皮细胞免于 TNF-E 介导的凋亡。图 6 描述的数据说明这是事实。HO-1 的过表达抑制了 TNF- $\alpha$ 介导的内皮细胞凋亡, 其例如在放线菌素 D 存在时发生的(图 12)。HO-1 的抗凋亡作用是通过其酶活性介导的, 因为将内皮细胞暴露于 SnPPIX 阻断了 HO-1 的抗凋亡作用(图 12)。用 SnPPIX 抑制 HO-1 活性情况下, 外源 CO(10,000ppm)抑制了 TNF-E 介导的凋亡, 说明 HO-1 抑制内皮细胞凋亡通过 CO 产生介导(图 12)。

### 15 一氧化碳抑制移植相关的动脉粥样硬化的发展

将 Brown Norway 主动脉移植给 Brown Norway 大鼠(同源的), 未处理的 Lewis 大鼠(同种的), 或暴露于一氧化碳的 Lewis 大鼠(250ppm; 同种的加一氧化碳)。移植后 56 天收获样品并用弹性组织 Masson 三色改良法(modified elastic tissue-masson trichrome), 或伊红苏木精染色。移植给 Lewis 大鼠的 Brown Norway 主动脉段发生动脉粥样硬化损害, 这与慢性移植排斥有关的动脉粥样硬化是一致的(数据未显示)。这些损害在移植后 20-30 天时变得明显, 并且在 50-60 天时更显著(数据未显示)。为此原因, 在移植后 56 天进行各种分析。这些损害的特征是内膜增生, 中层平滑肌细胞(SMC)丢失和外膜内白细胞聚集, 并且在移植受体的主动脉内未观察到(数据未显示)。当将大鼠主动脉段移植给同源受体时未观察到这些损害的迹象。为检验是否 CO 会抑制这些损害的发展, 将主动脉移植给同种异体受体, 该受体在移植后立即和随后的 56 天暴露于 CO(250ppm)。与移植给暴露于空气的受体的相比, 移植给暴露于 CO 的受体的主动脉移植物的内膜增生被抑制, 白细胞向外膜的聚集也受抑制(数据未显示)。与移植给未处理的受体的移植植物相比, CO 对中层 SMC 的丢失无明显作用(数据未显示)。

### 实施例 III. 在移植过程中用于器官和组织, 供体, 和受体治疗的方法

下面的实施例描述在移植过程中用一氧化碳治疗供体, 器官, 受体的方法。下面方法的任何一个或多个可被用于已知的移植过程。

#### **供体的治疗**

- 5 收获器官或组织前, 可以将供体用吸入性的一氧化碳(250ppm)治疗 1 小时。可以给予治疗以剂量范围从 10ppm 至 1000ppm, 时间范围从 1 小时至 6 小时, 或从可能治疗脑死亡(尸体)供体时刻起到取下器官的全部时间内。在宣布脑死亡后应尽可能早地开始治疗。在某些应用中, 可能希望在脑死亡前开始治疗。
- 10 对于用非人类动物(例如猪)作为异种移植供体, 只要所产生的碳氧血红蛋白不减低要移植器官的活力或功能, 如所希望, 可以将活的动物用相对高水平的吸入性一氧化碳治疗。例如, 可以使用高于 500ppm 的水平(例如, 1000ppm 或更高, 和高至 10,000ppm, 特别是对于短时间应用)。

#### **原位器官的治疗**

- 15 在从供体收获器官前, 当其仍在供体内时, 可以将其用例如缓冲液或培养基等没有血液红细胞的溶液灌注。意图是用溶液灌注器官且该溶液用一氧化碳饱和并用一氧化碳气维持以使一氧化碳含量维持饱和。灌注可以进行至少 10 分钟, 例如 1 小时, 几小时, 或更长。所述溶液应该可能理想地向器官的细胞释放最高浓度一氧化碳。

#### **器官或组织的治疗**

- 20 可以将器官或组织从供体取下时到移植给受体期间在包含一氧化碳的培养基中保存。这可通过在包含 CO 的培养基中维持器官或组织, 或通过用这样的培养基灌注来进行。因为这发生在体外而不是动物体内, 所以可以使用高浓度的 CO 气体(例如 10,000ppm 使培养基维持 CO 饱和)。

#### **受体的治疗**

- 25 可以用一氧化碳治疗受体。可以在移植当天手术开始前至少 30 分钟开始治疗。或者, 可以在受体内器官再灌注前至少 30 分钟开始。可以继续至少 30 分钟, 例如 1 小时。可以释放 10ppm 和 3000ppm 之间的一氧化碳不同时间, 例如, 几分钟或几小时, 并且可以在移植当天和随后的日子里给予。例如, 受体可以吸入例如 3000ppm 浓度的一氧化碳, 连续 3 次屏住呼吸 10 秒钟。或者, 受体可以吸入如 200ppm 持续更长时间, 例如 20 天。可
- 30



以利用碳氧血红蛋白浓度作为向患者适当给药一氧化碳的指标。通常，对受体的治疗不应使碳氧血红蛋白水平升高超过需要移植的患者可接受的风险的水平。

#### 其他实施方案

- 5 应当理解，当连同其详细说明描述了本发明时，前面的描述意在说明的目的，并不限制本发明的范围，该范围由附带的权利要求书的范围限定。其他方面，优点，和修改属于下面权利要求书的范畴。

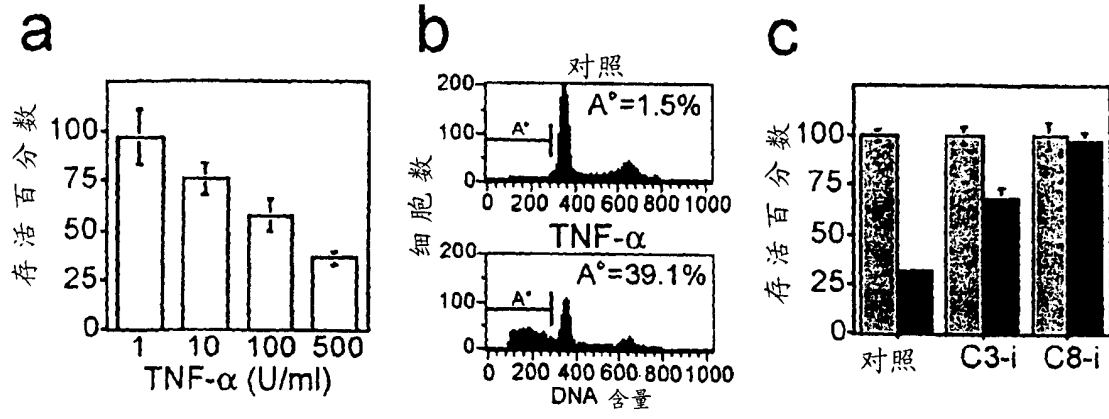


图 1

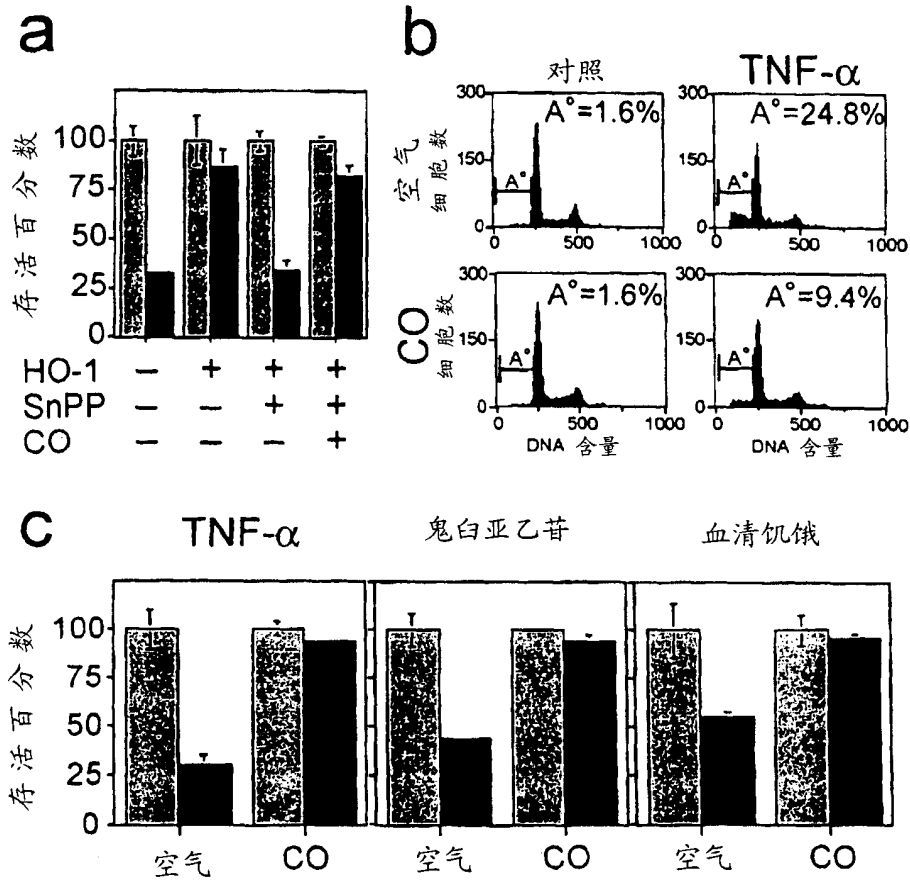


图 2

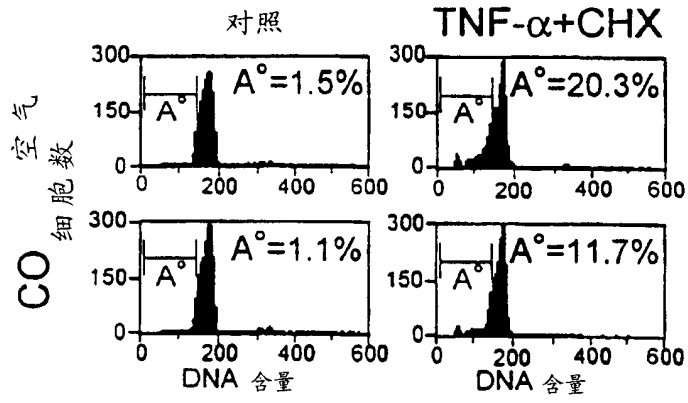


图 3

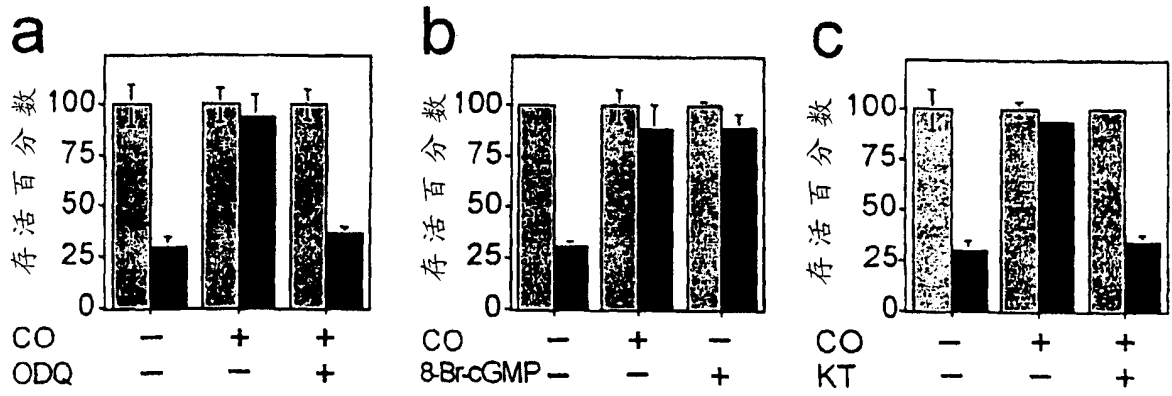


图 4

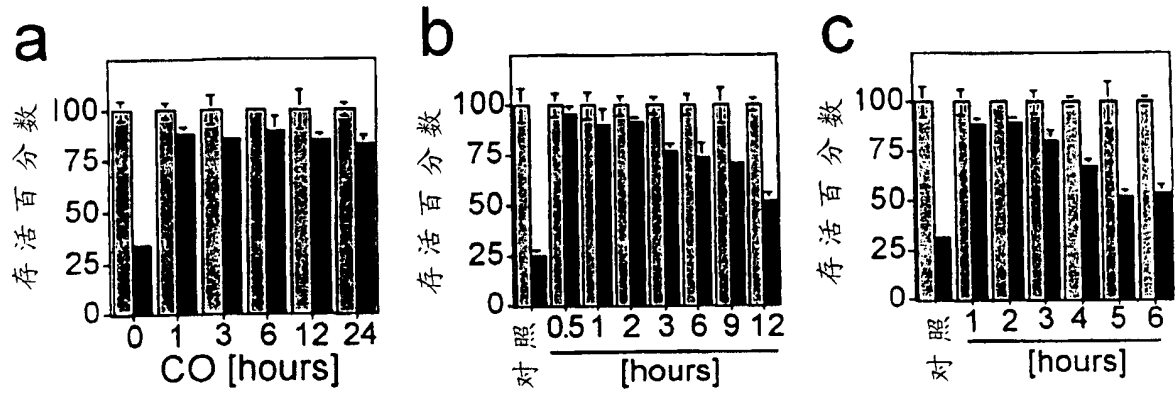


图 5

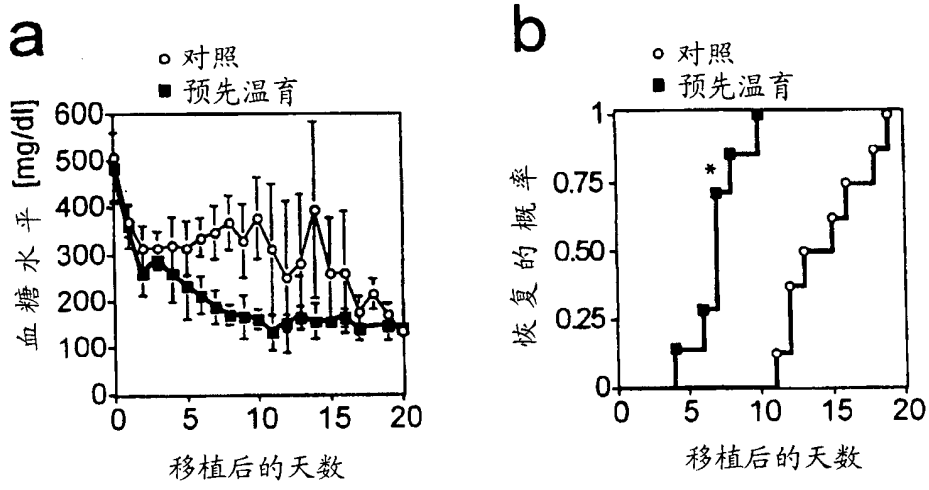


图 6

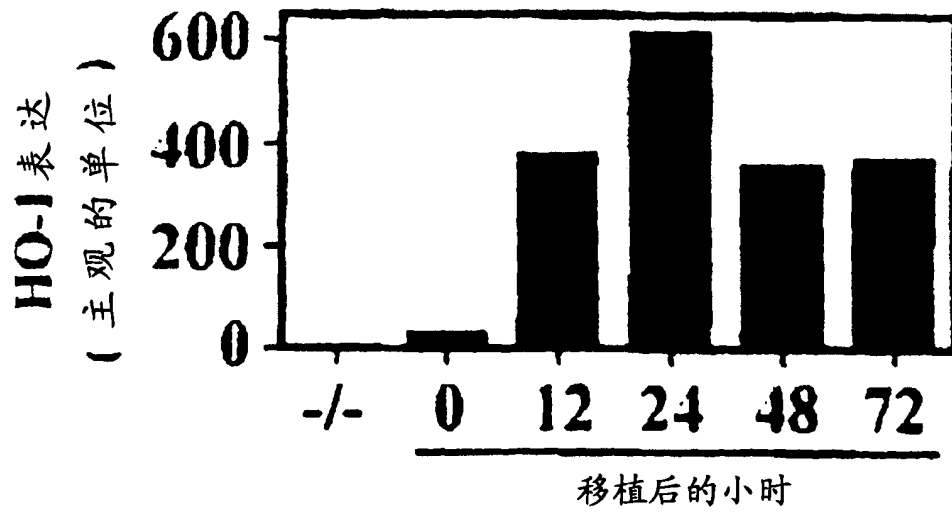


图 7



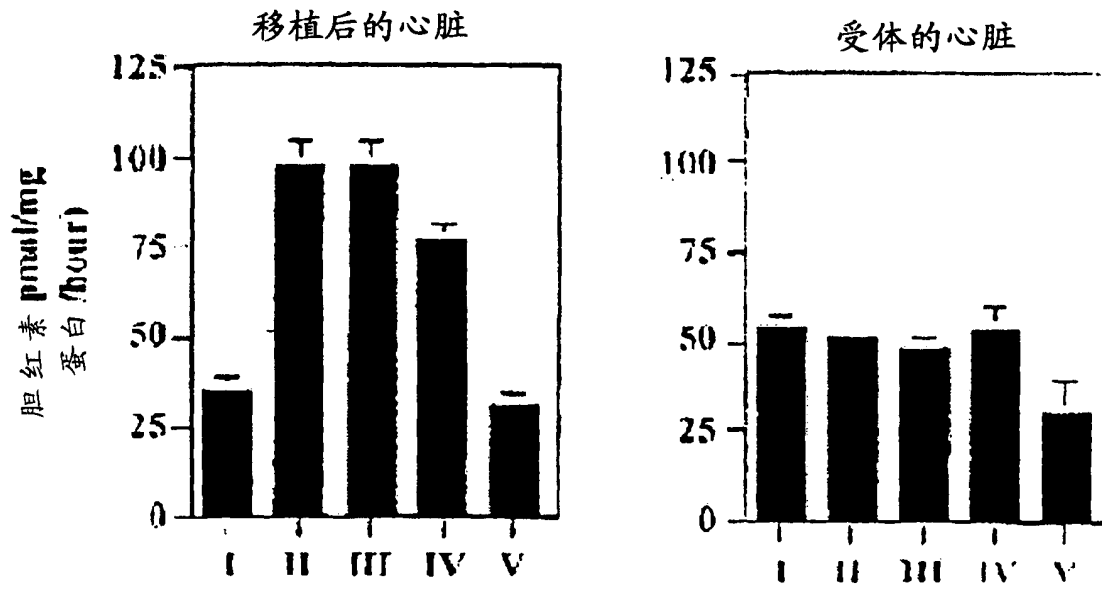


图 8

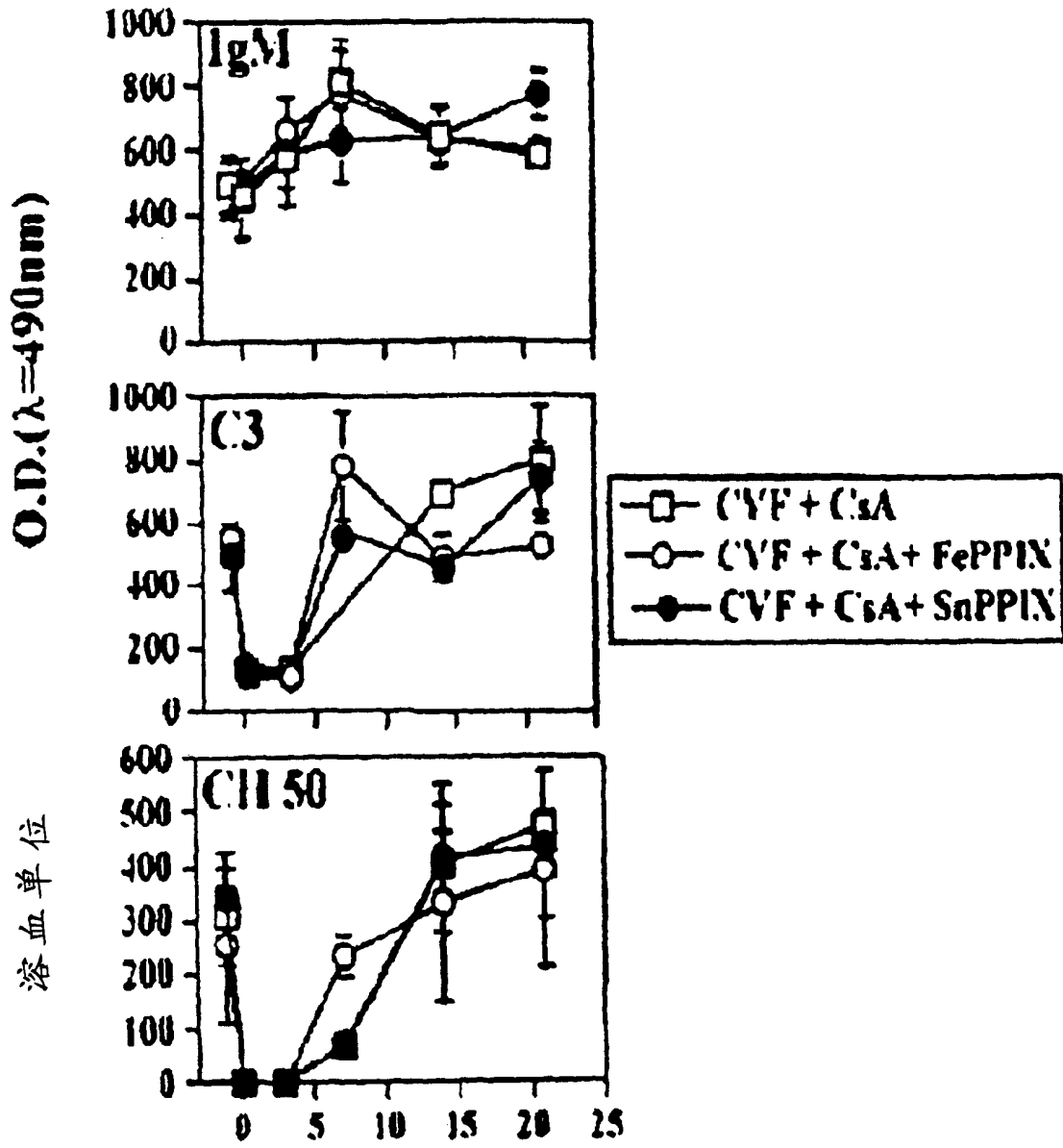


图 9

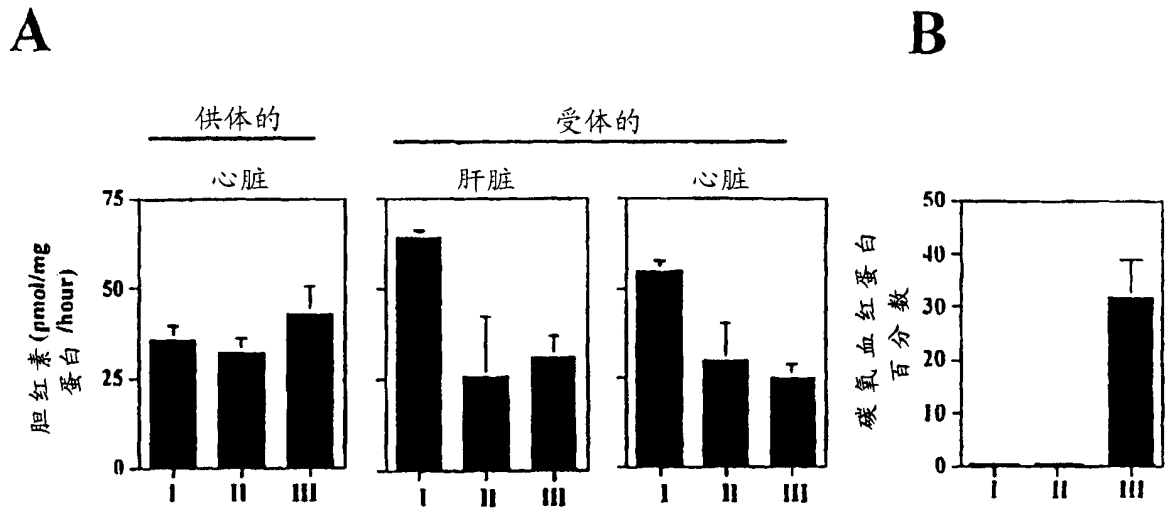


图 10

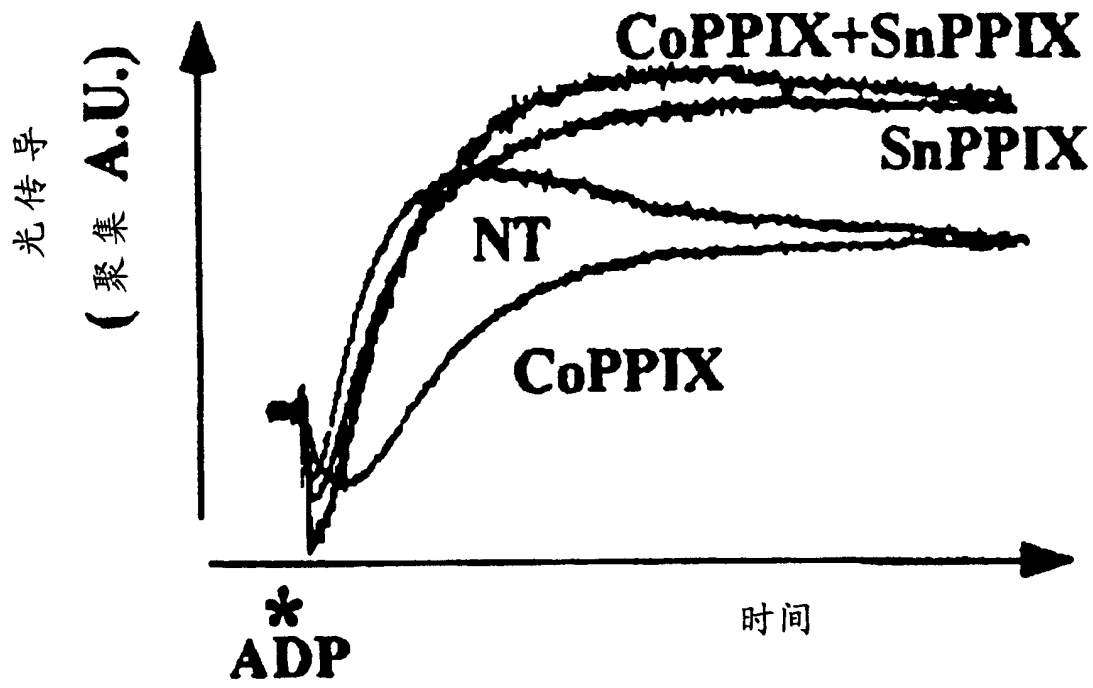


图 11

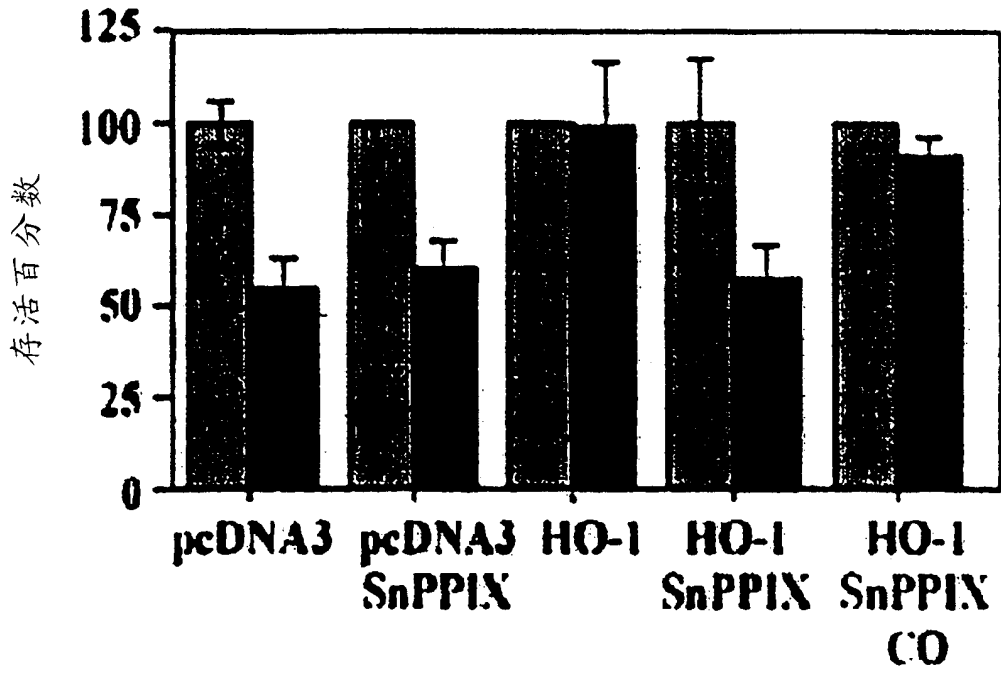


图 12