



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114269154 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 01

(21) 申请号 202080058469.4

(22) 申请日 2020.06.17

(30) 优先权数据

62/863,034 2019.06.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.02.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/038133 2020.06.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/257281 EN 2020.12.24

(71) 申请人 联合治疗公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 T·彼得森 S·霍根 R·伊拉甘

C·克洛尔

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

代理人 程淼 邹锋

(51) Int.Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/34 (2015.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

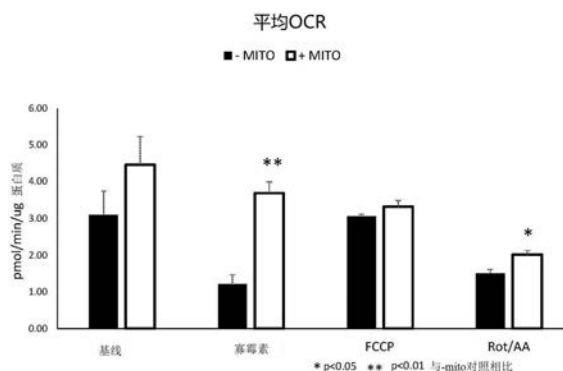
权利要求书30页 说明书70页 附图56页

(54) 发明名称

移植器官的线粒体处理

(57) 摘要

公开了与分离的线粒体有关的方法和组合物。例如,可以用分离的线粒体(例如猪线粒体)处理细胞、组织或器官,以改善细胞、组织或器官中的线粒体功能。线粒体功能的改善包括增加的耗氧量和增加的ATP合成。此类方法和组合物可用于细胞疗法;器官和组织移植;器官和组织改造;以及所收获的器官、组织和细胞的冷储存或运送。



1. 一种器官移植的方法,所述方法包括将分离的线粒体递送至预期用于移植的器官。
2. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括从供体中收获所述器官。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中在从所述供体中收获所述器官的步骤之前,将所述分离的线粒体递送至所述器官。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中在从所述供体中收获所述器官的步骤之后,将所述分离的线粒体递送至所述器官。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其进一步包括将用所述分离的线粒体处理的所述器官移植到受体内。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受体同种异体的分离的人线粒体。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受体自体的分离的人线粒体。
8. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述预期用于移植的器官从人供体中收获。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述人供体同种异体的分离的人线粒体。
10. 根据权利要求8所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述人供体自体的分离的人线粒体。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述预期用于移植的器官由猪器官支架进行改造。
12. 根据权利要求1-5、8或11中任一项所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应器官的细胞相比,用所述分离的线粒体处理的器官的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的三磷酸腺苷(ATP)合成。
15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述器官。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述器官是肺。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述肺移植到患有肺疾病或病症的人受体内。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述肺疾病或病症是肺高血压、支气管肺发育不良(BPD)、肺纤维化、哮喘、睡眠呼吸障碍或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、慢性血栓栓塞性肺高血压(CTEPH)、肺动脉高压(PAH)、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)、肺毛细血管瘤病(PCH)、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。
20. 根据权利要求16-19中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体通过气道、静

脉内或动脉内递送至所述肺。

21. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述器官是肾。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述肾移植到患有肾疾病或病症的人受体内。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述肾。

24. 一种改善受试者中所植入的组织或所移植的器官的性能的方法,所述方法包括在所述组织或器官的植入或移植之前、期间或之后,将分离的线粒体递送至组织或器官,其中所述组织或器官是供体组织、供体器官、改造的组织或改造的器官。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述组织或器官同种异体的分离的人线粒体。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述组织或器官自体的分离的人线粒体。

28. 根据权利要求24-27中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应组织或器官的细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述组织或器官的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的三磷酸腺苷(ATP)合成。

30. 根据权利要求24-29中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述器官。

31. 根据权利要求24-30中任一项所述的方法,其中所述组织或器官选自:血管、输尿管、气管和皮片。

32. 根据权利要求24-29中任一项所述的方法,其中所述器官是肺。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中将所述分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至所述肺。

34. 根据权利要求24-29中任一项所述的方法,其中所述器官是肾。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述肾。

36. 根据权利要求24-35中任一项所述的方法,其中所述组织或器官通过生物打印生成。

37. 一种改善经受离体肺灌注(EVLP)的肺的功能的方法,所述方法包括:

(i) 将分离的线粒体递送至肺,和

(ii) 通过用来自贮库的灌注液对所述肺进行灌注,在腔室或容器中对所述肺执行EVLP。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

39. 根据权利要求37所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述肺同种异体的分离的人线粒体。

40. 根据权利要求37所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述肺自体的分离的

人线粒体。

41. 根据权利要求37-40中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述肺的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

43. 根据权利要求37-42中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比, 用所述分离的线粒体处理的所述肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比, 用所述分离的线粒体处理的所述肺具有肺动脉压 (PAP)、潮气量 (TV)、动态顺应性、肺血管阻力 (PVR)、气体交换或其任何组合的稳定性或维持性增强。

45. 根据权利要求37-42中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比, 用所述分离的线粒体处理的所述肺具有一个或多个EVLP参数的至少5%的改善。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP、改善的TV、改善的动态顺应性、增加的葡萄糖/乳糖比、降低的细胞死亡的组织学测量、增加的血管生成和间隙连接形成、降低的PVR、减少的乳酸盐产生、减少的铵产生、改善的每分钟通气量、改善的血流量、减少的肺水肿、改善的肺弹性、改善的气体交换或其任何组合。

47. 根据权利要求37-46中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比, 用所述分离的线粒体处理的所述肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的活性氧 (ROS) 诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述间隙连接标记物包含连接粘附分子1 (JAM1) 和CD31。

49. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和干扰素- γ (IFN- γ)。

50. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-羟基壬烯醛 (4-HNE) 和8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG)。

51. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

52. 根据权利要求37-51中任一项所述的方法, 其进一步包括在执行EVLP之前, 从供体中收获所述肺的步骤。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其进一步包括在执行EVLP之后, 将所述肺移植到受体内的步骤。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述受体是患有肺疾病或病症的人受体。

55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述肺疾病或病症是肺高血压、支气管肺发育不良 (BPD)、肺纤维化、哮喘、睡眠呼吸障碍或慢性阻塞性肺疾病 (COPD)。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、慢性血栓栓塞性肺高血压 (CTEPH)、肺动脉高压 (PAH)、肺静脉闭塞性疾病 (PVOD)、肺毛细血管瘤病

(PCH)、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

57. 根据权利要求37-56中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过气道递送至所述肺。

58. 根据权利要求37-56中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体从所述贮库递送至所述肺。

59. 根据权利要求37-56中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述肺。

60. 根据权利要求37-59中任一项所述的方法, 其中在执行EVLP之前, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。

61. 根据权利要求37-59中任一项所述的方法, 其中在执行EVLP的同时, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。

62. 根据权利要求37-59中任一项所述的方法, 其中在执行EVLP之后, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。

63. 根据权利要求52或53所述的方法, 其中在从所述供体中收获所述肺的步骤之前, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。

64. 根据权利要求52或53所述的方法, 其中在从所述供体中收获所述肺的步骤之后, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。

65. 根据权利要求63或64所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至所述肺。

66. 根据权利要求37-65中任一项所述的方法, 其中所述灌注液包含Steen溶液、Perfadex、低钾右旋糖酐溶液、全血、稀释血液、浓缩红细胞(RBC)、血浆替代品、一种或多种血管扩张剂、碳酸氢钠、葡萄糖或其任何组合。

67. 根据权利要求37-66中任一项所述的方法, 其中将所述灌注液通过插管的肺动脉引入所述肺内。

68. 根据权利要求37-67中任一项所述的方法, 其中所述肺通过插管的气管在所述腔室或容器中进行通气。

69. 一种在运输、运送或储存期间用于使由于冷缺血对离体器官的损害降到最低的方法, 所述方法包括在冷缺血前0-24小时、在冷缺血期间或在冷缺血后0-24小时, 将分离的线粒体递送至所述器官,

其中与未用所述分离的线粒体处理的相应器官的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述器官的细胞具有至少5%的线粒体功能改善, 和

其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

70. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

71. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述器官同种异体的分离的人线粒体。

72. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述器官自体的分离的人线粒体。

73. 根据权利要求69-72中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相

应器官相比,用所述分离的线粒体处理的所述器官具有减少的ROS介导的氧化副产物产生、改善的细胞活力、减少的坏死、减少的细胞裂解、增加的细胞ATP的总水平、减少的炎性细胞因子分泌或其任何组合。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。

75. 根据权利要求73所述的方法,其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

76. 根据权利要求69-75中任一项所述的方法,其进一步包括从供体中收获所述器官的步骤。

77. 根据权利要求69-76中任一项所述的方法,其中在冷缺血前0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时,将所述分离的线粒体递送至所述器官。

78. 根据权利要求69-76中任一项所述的方法,其中在冷缺血期间,将所述分离的线粒体递送至所述器官。

79. 根据权利要求69-76中任一项所述的方法,其中在冷缺血后0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时,将所述分离的线粒体递送至所述器官。

80. 根据权利要求69-79中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送。

81. 根据权利要求69-80中任一项所述的方法,其中所述器官是肾。

82. 根据权利要求81所述的方法,其进一步包括将所述肾移植到患有肾疾病或病症的人受体内的步骤。

83. 根据权利要求81或82所述的方法,其进一步包括从受体中收获所述肾的步骤。

84. 根据权利要求69-79中任一项所述的方法,其中所述器官是肺,并且其中所述方法进一步包括通过用来自贮库的灌注液对所述肺进行灌注,在腔室或容器中对所述肺执行EVLP的步骤。

85. 根据权利要求84所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。

86. 根据权利要求85所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述肺具有PAP、TV、动态顺应性、PVR、气体交换或其任何组合的稳定性或维持性增强。

87. 根据权利要求84所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述肺具有一个或多个EVLP参数的至少5%的改善。

88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP、改善的TV、改善的动态顺应性、增加的葡萄糖/乳糖比、降低的细胞死亡的组织学测量、增加的血管生成和间隙连接形成、降低的PVR、减少的乳酸盐产生、减少的铵产生、改善的每分钟通气量、改善的血流量、减少的肺水肿、改善的肺弹性、改善的气体交换或其任何组合。

89. 根据权利要求84-88中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。

90. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述间隙连接标记物包含JAM1和CD31。
91. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。
92. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。
93. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。
94. 根据权利要求84-93中任一项所述的方法, 其进一步包括将所述肺移植到患有肺疾病或病症的人受体内的步骤。
95. 根据权利要求94所述的方法, 其中所述肺疾病或病症是肺高血压、支气管肺发育不良(BPD)、肺纤维化、哮喘、睡眠呼吸障碍或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。
96. 根据权利要求95所述的方法, 其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、慢性血栓栓塞性肺高血压(CTEPH)、肺动脉高压(PAH)、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)、肺毛细血管瘤病(PCH)、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。
97. 根据权利要求84-96中任一项所述的方法, 其进一步包括从受体中收获所述肺的步骤。
98. 根据权利要求84-97中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过气道递送至所述肺。
99. 根据权利要求84-97中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体从所述贮库递送至所述肺。
100. 根据权利要求84-97中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述肺。
101. 根据权利要求98-100中任一项所述的方法, 其中在执行EVLP之前, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。
102. 根据权利要求98-100中任一项所述的方法, 其中在执行EVLP的同时, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。
103. 根据权利要求98-100中任一项所述的方法, 其中在执行EVLP之后, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。
104. 根据权利要求97所述的方法, 其中在从所述供体中收获所述肺的步骤之前, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。
105. 根据权利要求97所述的方法, 其中在从所述供体中收获所述肺的步骤之后, 将所述分离的线粒体递送至所述肺。
106. 根据权利要求104或105所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至所述肺。
107. 根据权利要求84-106中任一项所述的方法, 其中所述灌注液包含Steen溶液、Perfadex、低钾右旋糖酐溶液、全血、稀释血液、浓缩RBC、血浆替代品、一种或多种血管扩张剂、碳酸氢钠、葡萄糖或其任何组合。
108. 根据权利要求84-107中任一项所述的方法, 其中将所述灌注液通过插管的肺动脉引入所述肺内。
109. 根据权利要求84-108中任一项所述的方法, 其中所述肺通过插管的气管在所述腔

室或容器中进行通气。

110. 一种用于改善改造的器官或组织的功能的方法,所述方法包括:

(i) 制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架,

(ii) 用填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的所述器官或组织支架,以产生改造的器官或组织,和

(iii) 将分离的线粒体递送至所述改造的器官或组织。

111. 根据权利要求110所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

112. 根据权利要求110所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述改造的器官或组织同种异体的分离的人线粒体。

113. 根据权利要求110所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述改造的器官或组织自体的分离的人线粒体。

114. 根据权利要求110所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织的细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的器官或组织的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

115. 根据权利要求114所述的方法,其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

116. 根据权利要求110-115中任一项所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述改造的器官或组织是改造的人肾。

117. 根据权利要求110-115中任一项所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述改造的器官或组织是改造的人肺。

118. 根据权利要求117所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。

119. 根据权利要求118所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有PAP、TV、动态顺应性、PVR、气体交换或其任何组合的稳定性或维持性增强。

120. 根据权利要求117所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的至少5%的改善。

121. 根据权利要求120所述的方法,其中所述一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP、改善的TV、改善的动态顺应性、增加的葡萄糖/乳糖比、降低的细胞死亡的组织学测量、增加的血管生成和间隙连接形成、降低的PVR、减少的乳酸盐产生、减少的铵产生、改善的每分钟通气量、改善的血流量、减少的肺水肿、改善的肺弹性、改善的气体交换或其任何组合。

122. 根据权利要求117-121中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。

123. 根据权利要求122所述的方法,其中所述间隙连接标记物包含JAM1和CD31。

124. 根据权利要求122所述的方法,其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。

125. 根据权利要求122所述的方法, 其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

126. 根据权利要求122所述的方法, 其中所述ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

127. 根据权利要求110-126中任一项所述的方法, 其中所述填充细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

128. 根据权利要求127所述的方法, 其中所述上皮细胞包含I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞或其任何组合。

129. 根据权利要求127所述的方法, 其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

130. 根据权利要求127所述的方法, 其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

131. 根据权利要求127所述的方法, 其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

132. 根据权利要求110-131中任一项所述的方法, 其中在填充所述器官或组织支架的步骤之后, 将所述分离的线粒体递送至所述改造的器官或组织。

133. 根据权利要求110-131中任一项所述的方法, 其中在填充所述器官或组织支架的步骤期间, 将所述分离的线粒体递送至所述改造的器官或组织。

134. 根据权利要求133所述的方法, 其中将所述分离的线粒体连同所述生物反应器、腔室或容器中的所述填充细胞一起递送至所述改造的器官或组织。

135. 根据权利要求132-134中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体静脉内、动脉内或通过灌注递送至所述改造的器官或组织。

136. 根据权利要求110-135中任一项所述的方法, 其中在所述生物反应器、腔室或容器中填充所述器官或组织支架之前, 将分离的线粒体注入所述器官或组织支架。

137. 根据权利要求110-136中任一项所述的方法, 其中所述器官或组织支架通过生物打印生成。

138. 根据权利要求137所述的方法, 其中所述填充细胞和所述人工器官或组织基质同时进行生物打印, 以产生所述改造的器官或组织。

139. 一种用于改善改造的器官或组织的功能的方法, 所述方法包括:

(i) 制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架, 和

(ii) 用由分离的线粒体处理的细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的所述器官或组织支架, 以产生改造的器官或组织。

140. 根据权利要求139所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

141. 根据权利要求139所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的器官或组织同种异体的分离的人线粒体。

142. 根据权利要求139所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的器官或组织自体的分离的人线粒体。

143. 根据权利要求139-142中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述改造的器官或组织的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

144. 根据权利要求143所述的方法,其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

145. 根据权利要求139-144中任一项所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述改造的器官或组织是改造的人肾。

146. 根据权利要求139-144中任一项所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述改造的器官或组织是改造的人肺。

147. 根据权利要求146所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。

148. 根据权利要求147所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有PAP、TV、动态顺应性、PVR、气体交换或其任何组合的稳定性或维持性增强。

149. 根据权利要求146所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的至少5%的改善。

150. 根据权利要求149所述的方法,其中所述一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP、改善的TV、改善的动态顺应性、增加的葡萄糖/乳糖比、降低的细胞死亡的组织学测量、增加的血管生成和间隙连接形成、降低的PVR、减少的乳酸盐产生、减少的铵产生、改善的每分钟通气量、改善的血流量、减少的肺水肿、改善的肺弹性、改善的气体交换或其任何组合。

151. 根据权利要求146-150中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。

152. 根据权利要求151所述的方法,其中所述间隙连接标记物包含JAM1和CD31。

153. 根据权利要求151所述的方法,其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。

154. 根据权利要求151所述的方法,其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

155. 根据权利要求151所述的方法,其中所述ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

156. 根据权利要求139-155中任一项所述的方法,其中所述填充细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

157. 根据权利要求156所述的方法,其中所述上皮细胞包含I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞或其任何组合。

158. 根据权利要求156所述的方法,其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

159. 根据权利要求156所述的方法,其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

160. 根据权利要求156所述的方法,其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

161. 根据权利要求139-160中任一项所述的方法,其中在所述生物反应器、腔室或容器

中填充所述器官或组织支架之前,将分离的线粒体注入所述器官或组织支架。

162. 根据权利要求139-161中任一项所述的方法,其中所述器官或组织支架通过生物打印生成。

163. 根据权利要求162所述的方法,其中所述填充细胞和所述人工器官或组织基质同时进行生物打印,以产生所述改造的器官或组织。

164. 一种用于改善改造的器官或组织的功能的方法,所述方法包括:

(i) 制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架,

(ii) 将分离的线粒体注入所述器官或组织支架,和

(iii) 用填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的所述注入的器官或组织支架,以产生改造的器官或组织。

165. 根据权利要求164所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

166. 根据权利要求164所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述改造的器官或组织同种异体的分离的人线粒体。

167. 根据权利要求164所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述改造的器官或组织自体的分离的人线粒体。

168. 根据权利要求164-167中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织的细胞相比,所述改造的器官或组织的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

169. 根据权利要求168所述的方法,其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

170. 根据权利要求164-169中任一项所述的方法,其中所述改造的器官或组织是改造的人肾。

171. 根据权利要求164-169中任一项所述的方法,其中所述改造的器官或组织是改造的人肺。

172. 根据权利要求171所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,所述改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。

173. 根据权利要求172所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,所述改造的人肺具有PAP、TV、动态顺应性、PVR、气体交换或其任何组合的稳定性或维持性增强。

174. 根据权利要求171所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,所述改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的至少5%的改善。

175. 根据权利要求174所述的方法,其中所述一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP、改善的TV、改善的动态顺应性、增加的葡萄糖/乳糖比、降低的细胞死亡的组织学测量、增加的血管生成和间隙连接形成、降低的PVR、减少的乳酸盐产生、减少的铵产生、改善的每分钟通气量、改善的血流量、减少的肺水肿、改善的肺弹性、改善的气体交换或其任何组合。

176. 根据权利要求171-175中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的人肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的活性氧(ROS)诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。

177. 根据权利要求176所述的方法, 其中所述间隙连接标记物包含JAM1和CD31。

178. 根据权利要求176所述的方法, 其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。

179. 根据权利要求176所述的方法, 其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

180. 根据权利要求176所述的方法, 其中所述ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GR0 α 。

181. 根据权利要求164-180中任一项所述的方法, 其中所述填充细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

182. 根据权利要求181所述的方法, 其中所述上皮细胞包含I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞或其任何组合。

183. 根据权利要求181所述的方法, 其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

184. 根据权利要求181所述的方法, 其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

185. 根据权利要求181所述的方法, 其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

186. 根据权利要求164-185中任一项所述的方法, 其中所述器官或组织支架通过生物打印生成。

187. 根据权利要求186所述的方法, 其中所述填充细胞和所述人工器官或组织基质同时进行生物打印, 以产生所述改造的器官或组织。

188. 一种用于改善改造的肺的功能的方法, 所述方法包括:

(i) 用重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肺, 以产生改造的肺; 和

(ii) 将分离的线粒体递送至所述改造的肺。

189. 根据权利要求188所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

190. 根据权利要求188所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肺同种异体的分离的人线粒体。

191. 根据权利要求188所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肺自体的分离的人线粒体。

192. 根据权利要求188-191中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肺的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述改造的肺的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

193. 根据权利要求192所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量。

194. 根据权利要求193所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的ATP合成。

195. 根据权利要求188-194中任一项所述的方法, 其中所述重新填充细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

196. 根据权利要求195所述的方法, 其中所述上皮细胞包含I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞或其任何组合。

197. 根据权利要求195所述的方法, 其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞

(HPAEC)。

198. 根据权利要求195所述的方法,其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

199. 根据权利要求195所述的方法,其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

200. 根据权利要求188-199中任一项所述的方法,其中在重新填充所述脱细胞支架肺的步骤之后,将所述分离的线粒体递送至所述改造的肺。

201. 根据权利要求188-199中任一项所述的方法,其中在重新填充所述脱细胞支架肺的步骤期间,将所述分离的线粒体递送至所述改造的肺。

202. 根据权利要求201所述的方法,其中将所述分离的线粒体连同所述生物反应器、腔室或容器中的所述重新填充细胞一起递送至所述改造的肺。

203. 根据权利要求200-202中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至所述改造的肺。

204. 根据权利要求188所述的方法,其进一步包括通过用来自贮库的灌注液对所述改造的肺进行灌注,对所述改造的肺执行EVLP的步骤。

205. 根据权利要求204所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。

206. 根据权利要求205所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的肺具有PAP、TV、动态顺应性、PVR、气体交换或其任何组合的稳定性或维持性增强。

207. 根据权利要求204所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述改造的肺具有一个或多个EVLP参数的至少5%的改善。

208. 根据权利要求207所述的方法,其中所述一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP、改善的TV、改善的动态顺应性、增加的葡萄糖/乳糖比、降低的细胞死亡的组织学测量、增加的血管生成和间隙连接形成、降低的PVR、减少的乳酸盐产生、减少的铵产生、改善的每分钟通气量、改善的血流量、减少的肺水肿、改善的肺弹性、改善的气体交换或其任何组合。

209. 根据权利要求204-208中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至所述改造的肺。

210. 根据权利要求204-208中任一项所述的方法,其中将所述分离的线粒体从所述贮库递送至所述改造的肺。

211. 根据权利要求209或210所述的方法,其中在执行EVLP之前,将所述分离的线粒体递送至所述改造的肺。

212. 根据权利要求209或210所述的方法,其中在执行EVLP的同时,将所述分离的线粒体递送至所述改造的肺。

213. 根据权利要求204-212中任一项所述的方法,其中所述灌注液包含Steen溶液、Perfadex、低钾右旋糖酐溶液、全血、稀释血液、浓缩RBC、血浆替代品、一种或多种血管扩张剂、碳酸氢钠、葡萄糖或其任何组合。

214. 根据权利要求204-213中任一项所述的方法,其中将所述灌注液通过插管的肺动

脉引入所述改造的肺内。

215. 根据权利要求204-214中任一项所述的方法, 其中所述改造的肺通过插管的气管在所述生物反应器、腔室或容器中进行通气。

216. 一种用于改善改造的肺的功能的方法, 所述方法包括:

(i) 将分离的线粒体递送至重新填充细胞; 和

(ii) 用由所述分离的线粒体处理的所述重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肺, 以产生改造的肺。

217. 根据权利要求216所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

218. 根据权利要求216所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肺同种异体的分离的人线粒体。

219. 根据权利要求216所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肺自体的分离的人线粒体。

220. 根据权利要求216所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肺的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述改造的肺的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

221. 根据权利要求220所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量。

222. 根据权利要求220所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的ATP合成。

223. 根据权利要求216-222中任一项所述的方法, 其中所述重新填充细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

224. 根据权利要求223所述的方法, 其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

225. 根据权利要求223所述的方法, 其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

226. 根据权利要求223所述的方法, 其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

227. 根据权利要求216-226中任一项所述的方法, 其进一步包括通过用来自贮库的灌注液对所述改造的肺进行灌注, 对所述改造的肺执行EVLP的步骤。

228. 根据权利要求227所述的方法, 其中所述灌注液包含Steen溶液、Perfadex、低钾右旋糖酐溶液、全血、稀释血液、浓缩RBC、血浆替代品、一种或多种血管扩张剂、碳酸氢钠、葡萄糖或其任何组合。

229. 根据权利要求227或228所述的方法, 其中将所述灌注液通过插管的肺动脉引入所述改造的肺内。

230. 根据权利要求227-229中任一项所述的方法, 其中所述改造的肺通过插管的气管在所述生物反应器、腔室或容器中进行通气。

231. 一种用于改善改造的肾的功能的方法, 所述方法包括:

(i) 用重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肾, 以产生改造的肾; 和

(ii) 将分离的线粒体递送至所述改造的肾。

232. 根据权利要求231所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

233. 根据权利要求231所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肾同种异体的分离的人线粒体。

234. 根据权利要求231所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肾自体的分离的人线粒体。

235. 根据权利要求231-234中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肾的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述改造的肾的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

236. 根据权利要求235所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量。

237. 根据权利要求235所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的ATP合成。

238. 根据权利要求231-237中任一项所述的方法, 其中所述重新填充细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

239. 根据权利要求238所述的方法, 其中所述上皮细胞包含上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

240. 根据权利要求239所述的方法, 其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

241. 根据权利要求231-240中任一项所述的方法, 其中在重新填充所述脱细胞支架肾的步骤之后, 将所述分离的线粒体递送至所述改造的肾。

242. 根据权利要求231-240中任一项所述的方法, 其中在重新填充所述脱细胞支架肾的步骤期间, 将所述分离的线粒体递送至所述改造的肾。

243. 根据权利要求242所述的方法, 其中将所述分离的线粒体连同所述生物反应器、腔室或容器中的所述重新填充细胞一起递送至所述改造的肾。

244. 根据权利要求231-243中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述改造的肾。

245. 一种用于改善改造的肾的功能的方法, 所述方法包括:

(i) 将分离的线粒体递送至重新填充细胞; 和

(ii) 用由所述分离的线粒体处理的所述重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肾, 以产生改造的肾。

246. 根据权利要求245所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

247. 根据权利要求245所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肾同种异体的分离的人线粒体。

248. 根据权利要求245所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述改造的肾自体的分离的人线粒体。

249. 根据权利要求245-248中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应改造的肾的细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述改造的肾的细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

250. 根据权利要求249所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量。

251. 根据权利要求249所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的ATP合成。

252. 根据权利要求245-251中任一项所述的方法, 其中所述重新填充细胞包含上皮细

胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞或其任何组合。

253. 根据权利要求252所述的方法,其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

254. 根据权利要求1-253中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应器官、组织、肾或肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述器官、组织、肾或肺具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。

255. 根据权利要求254所述的方法,其中所述减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少相关。

256. 根据权利要求254所述的方法,其中所述减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少相关。

257. 根据权利要求254-256中任一项所述的方法,其中所述减少的炎症和/或免疫细胞活化与一种或多种促炎细胞因子或趋化因子的分泌减少相关,所述促炎细胞因子或趋化因子选自:MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15和TGF- β 1。

258. 根据权利要求254-257中任一项所述的方法,其中所述减少的炎症和/或免疫细胞活化与一种或多种活化标记物的表达减少相关,所述活化标记物选自:CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38和CD154 (CD40L)。

259. 根据权利要求254-258中任一项所述的方法,其中所述减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少相关。

260. 根据权利要求1-259中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应器官、组织、肾或肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述器官、组织、肾或肺具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的功能是细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。

261. 根据权利要求260所述的方法,其中所述减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的血色素加氧酶-1 (HO-1) 表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。

262. 根据权利要求261所述的方法,其中所述改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。

263. 根据权利要求260所述的方法,其中所述减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合相关。

264. 根据权利要求263所述的方法,其中所述减少的细胞凋亡与至少一种促凋亡标记物的表达减少相关。

265. 根据权利要求264所述的方法,其中所述至少一种促凋亡标记物是BIM、PUMA、BAX、BAK、SMAC、DIABLO、BID、NOXA、BIK或其任何组合。

266. 根据权利要求263所述的方法,其中所述减少的细胞凋亡与至少一种抗凋亡标记

物的表达增加相关。

267. 根据权利要求266所述的方法,其中所述至少一种抗凋亡标记物是BCL-2、BCL-XL、BCL-W、MCL-1、A1/BFL-1或其任何组合。

268. 根据权利要求1-267中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应器官、组织、肾或肺相比,用所述分离的线粒体处理的所述器官、组织、肾或肺具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。

269. 根据权利要求268所述的方法,其中所述增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加相关。

270. 根据权利要求1-269中任一项所述的方法,其中所述器官、组织、肾或肺是人器官、组织、肾或肺。

271. 一种用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,所述方法包括向所述受试者或供体肺施用药物组合物,所述药物组合物包含已用分离的线粒体预处理的间充质干细胞或内皮祖细胞、或者从所述间充质干细胞或内皮祖细胞中分离的细胞外囊泡。

272. 一种用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,所述方法包括向所述受试者或供体肺施用(A)间充质干细胞或内皮祖细胞、或者从所述间充质干细胞或内皮祖细胞中分离的细胞外囊泡,和(B)分离的线粒体,其中(A)和(B)包含在单一药物组合物或两种分开的药物组合物中。

273. 根据权利要求271或272所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

274. 根据权利要求271或272所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者或供体肺同种异体的分离的人线粒体。

275. 根据权利要求271或272所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者或供体肺自体的分离的人线粒体。

276. 根据权利要求271-275中任一项所述的方法,其中所述肺疾病或病症是肺高血压、支气管肺发育不良(BPD)、肺纤维化、哮喘、睡眠呼吸障碍或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。

277. 根据权利要求276所述的方法,其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、慢性血栓栓塞性肺高血压(CTEPH)、肺动脉高压(PAH)、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)、肺毛细血管瘤病(PCH)、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

278. 一种用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症的方法,所述方法包括:

(i) 向所述受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,和

(ii) 施用治疗有效量的用于治疗肺疾病或病症的药物,

其中在用于治疗所述肺疾病或病症的所述药物施用之前、同时或之后,将所述组合物施用于所述受试者。

279. 根据权利要求278所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

280. 根据权利要求278所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

281. 根据权利要求278所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

282. 根据权利要求278-281中任一项所述的方法,其中所述肺疾病或病症是肺高血压、哮喘、睡眠呼吸障碍、BPD、COPD或肺纤维化。

283. 根据权利要求282所述的方法,其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、CTEPH、PAH、PVOD、PCH、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

284. 根据权利要求278-283中任一项所述的方法,其中用于治疗所述肺疾病或病症的所述药物选自:曲前列尼尔、依前列醇、伊洛前列素、波生坦、安立生坦、马西替坦和西地那非。

285. 一种用于治疗有此需要的受试者中的肺高血压的方法,所述方法包括:

(i) 向所述受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,和

(ii) 施用治疗有效量的曲前列尼尔,

其中在曲前列尼尔施用之前、同时或之后,将所述组合物施用于所述受试者。

286. 根据权利要求285所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

287. 根据权利要求285所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

288. 根据权利要求285所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

289. 根据权利要求285-288中任一项所述的方法,其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、CTEPH、PAH、PVOD、PCH、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

290. 一种用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,所述方法包括:

(i) 向所述受试者或供体肺施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,和

(ii) 向所述受试者或供体肺施用治疗有效量的UNEX-42,

其中在UNEX-42施用之前、同时或之后,向所述受试者或供体肺施用组合物。

291. 根据权利要求290所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

292. 根据权利要求290所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

293. 根据权利要求290所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

294. 一种用于治疗有此需要的受试者的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,所述方法包括:

(i) 向所述受试者或供体肺施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,和

(ii) 向所述受试者或供体肺施用治疗有效量的抗氧化剂,

其中在抗氧化剂施用之前、同时或之后,向所述受试者或供体肺施用组合物。

295. 根据权利要求294所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

296. 根据权利要求294所述的方法,其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异

体的分离的人线粒体。

297. 根据权利要求294所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

298. 根据权利要求294-297中任一项所述的方法, 其中所述抗氧化剂是n-乙酰半胱氨酸、tempol或白藜芦醇。

299. 根据权利要求294-298中任一项所述的方法, 其中所述抗氧化剂与包含分离的线粒体的所述组合物同时和作为所述组合物的部分施用于所述受试者或供体肺。

300. 一种用于治疗受试者中的肺疾病或病症的急性加重的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含分离的线粒体的组合物用于救援疗法。

301. 根据权利要求300所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

302. 根据权利要求300所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

303. 根据权利要求300所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

304. 根据权利要求300-303中任一项所述的方法, 其中所述肺疾病或病症是肺高血压、哮喘、睡眠呼吸障碍、BPD、COPD或肺纤维化。

305. 根据权利要求304所述的方法, 其中所述肺高血压是由于COPD的肺高血压、CTEPH、PAH、PVOD、PCH、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

306. 一种用于治疗有此需要的受试者中的急性肾损伤的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物。

307. 根据权利要求306所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

308. 根据权利要求306所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

309. 根据权利要求306所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

310. 根据权利要求306-309中任一项所述的方法, 其中施用治疗有效量的所述组合物减少所述受试者中的一种或多种促炎细胞因子或促炎介质的血清水平。

311. 根据权利要求310所述的方法, 其中所述一种或多种促炎细胞因子或促炎介质选自: 单核细胞趋化蛋白1 (MCP1)、C3A和C5a。

312. 根据权利要求306-311中任一项所述的方法, 其中施用治疗有效量的所述组合物减少所述受试者中的肾损伤分子-1 (KIM1) 血清水平。

313. 根据权利要求306-312中任一项所述的方法, 其中施用治疗有效量的所述组合物减少所述受试者中的血尿素氮 (BUN) 水平。

314. 根据权利要求306-313中任一项所述的方法, 其中施用治疗有效量的所述组合物减少所述受试者中的肾重量。

315. 一种用于治疗处于心脏骤停或经历复苏的受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的包含分离的线粒体的组合物, 以促进其运输到医疗设施或医学治疗。

316. 根据权利要求315所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

317. 根据权利要求315所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

318. 根据权利要求278-317中任一项所述的方法, 其中所述组合物通过吸入施用于所述受试者。

319. 根据权利要求278-317中任一项所述的方法, 其中所述组合物通过肺气道施用于所述受试者或供体肺。

320. 根据权利要求278-317中任一项所述的方法, 其中所述组合物通过注射施用于所述受试者或供体肺。

321. 根据权利要求278-320中任一项所述的方法, 其中所述组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

322. 根据权利要求321所述的方法, 其中所述至少一种药学上可接受的载体或赋形剂选自: 呼吸缓冲液、一种或多种细胞外基质组分、器官或组织保存溶液、盐水、水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、一种或多种多元醇和植物油。

323. 根据权利要求278-322中任一项所述的方法, 其中所述组合物进一步包含至少一种活性成分。

324. 根据权利要求323所述的方法, 其中所述至少一种活性成分选自: 曲前列尼尔、抗氧化剂、UNEX-42和抗炎剂。

325. 根据权利要求278-324中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人受试者。

326. 一种保存用于运输和移植的组织或器官的方法, 所述方法包括将分离的线粒体递送至预期用于运输和移植的组织或器官, 其中所述组织或器官从已故供体获得。

327. 根据权利要求326所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

328. 根据权利要求326所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述已故供体同种异体的分离的人线粒体。

329. 根据权利要求326所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述已故供体自体的分离的人线粒体。

330. 根据权利要求326-329中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体在所述供体死亡后24小时内递送至所述组织或器官。

331. 根据权利要求326-329中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体在所述供体死亡后12小时内递送至所述组织或器官。

332. 根据权利要求326-329中任一项所述的方法, 其中将所述分离的线粒体在所述供体死亡后4小时内递送至所述组织或器官。

333. 根据权利要求326-332中任一项所述的方法, 其进一步包括通过从所述已故供体中收获组织或器官, 从所述已故供体获得所述组织或器官的步骤。

334. 根据权利要求333所述的方法, 其中在从所述已故供体中收获组织或器官之前, 将所述分离的线粒体递送至所述组织或器官。

335. 根据权利要求333所述的方法, 其中在从所述已故供体中收获组织或器官之后, 将所述分离的线粒体递送至所述组织或器官。

336. 根据权利要求326-335中任一项所述的方法, 其中所述组织或器官选自: 心脏、肝、

肺、血管、输尿管、气管、皮片或肾。

337. 根据权利要求336所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过注射递送至所述组织或器官。

338. 根据权利要求336所述的方法, 其中所述组织或器官是肾。

339. 根据权利要求338所述的方法, 其中将所述分离的线粒体静脉内或动脉内递送至所述肾。

340. 根据权利要求336所述的方法, 其中所述组织或器官是肺。

341. 根据权利要求340所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至所述肺。

342. 根据权利要求340所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过EVLP递送至所述肺。

343. 根据权利要求326-342中任一项所述的方法, 其中所述组织或器官是人组织或器官。

344. 一种保存由于创伤性截肢而丢失的肢体或其它身体部位的方法, 所述方法包括在所述肢体或其它身体部位的所述创伤性截肢之后, 将分离的线粒体递送至所述肢体或其它身体部位。

345. 根据权利要求344所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

346. 根据权利要求344所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述肢体或其它身体部位同种异体的分离的人线粒体。

347. 根据权利要求344所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述肢体或其它身体部位自体的分离的人线粒体。

348. 根据权利要求344所述的方法, 其中在所述创伤性截肢后不迟于15分钟、30分钟、1小时、4小时、8小时、12小时或24小时, 将所述分离的线粒体递送至所述被截肢的肢体或其它身体部位。

349. 根据权利要求347或348所述的方法, 其中将所述分离的线粒体通过注射递送至所述被截肢的肢体或其它身体部位。

350. 根据权利要求344-349中任一项所述的方法, 其中所述肢体或其它身体部位是人的肢体或其它身体部位。

351. 一种减轻有此需要的受试者中的炎症的方法, 所述方法包括:

(ii) 将分离的线粒体递送至从所述受试者中分离的造血谱系细胞, 和

(iii) 将用所述分离的线粒体处理的所述造血谱系细胞施用于所述受试者。

352. 根据权利要求351所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

353. 根据权利要求351所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

354. 根据权利要求351所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

355. 根据权利要求351所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应造血细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述造血谱系细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

356. 根据权利要求355所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

357. 根据权利要求351-356中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述造血谱系细胞的步骤之前,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入所述分离的造血谱系细胞内的步骤。

358. 根据权利要求351-356中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述造血谱系细胞的步骤之后,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入所述分离的造血谱系细胞内的步骤。

359. 根据权利要求351-356中任一项所述的方法,其中所述分离的造血谱系细胞是髓样细胞或髓样前体细胞。

360. 根据权利要求359所述的方法,其中所述髓样细胞或髓样前体细胞是单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、造血干细胞、髓样祖细胞或其任何组合。

361. 根据权利要求351-360中任一项所述的方法,其中所述造血谱系细胞从所述受试者的外周血中分离。

362. 根据权利要求361所述的方法,其中在从所述外周血中分离所述造血谱系细胞之前,所述受试者已用干细胞动员剂进行治疗。

363. 根据权利要求362所述的方法,其中所述干细胞动员剂是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。

364. 根据权利要求351-360中任一项所述的方法,其中所述造血谱系细胞从所述受试者的骨髓中分离。

365. 根据权利要求351-364中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述分离的造血谱系细胞的步骤之前,使所述分离的造血谱系细胞离体分化的步骤。

366. 根据权利要求351-364中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述分离的造血谱系细胞的步骤之后,使所述分离的造血谱系细胞离体分化的步骤。

367. 根据权利要求365或366所述的方法,其中使所述分离的造血谱系细胞离体分化成具有M1或M2表型的巨噬细胞。

368. 根据权利要求351-367中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应造血谱系细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述造血谱系细胞具有NF- κ B的减少表达。

369. 根据权利要求351-368中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应造血谱系细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述造血谱系细胞具有促炎细胞因子或趋化因子的减少分泌,所述促炎细胞因子或趋化因子选自:MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合。

370. 根据权利要求351-369中任一项所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述分离的造血谱系细胞通过注射施用于所述受试者。

371. 根据权利要求351-370中任一项所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述分离的造血谱系细胞作为微载体的部分施用于所述受试者。

372. 根据权利要求351-371中任一项所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

373. 一种改善分离的细胞的细胞功能的方法, 所述方法包括将分离的线粒体递送至所述分离的细胞。

374. 根据权利要求373所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

375. 根据权利要求373所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述分离的细胞同种异体的分离的人线粒体。

376. 根据权利要求373所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

377. 根据权利要求376所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

378. 根据权利要求373-377中任一项所述的方法, 其中所述分离的细胞是上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

379. 根据权利要求378所述的方法, 其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

380. 根据权利要求378所述的方法, 其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

381. 根据权利要求378所述的方法, 其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

382. 根据权利要求378所述的方法, 其中所述免疫细胞包含造血细胞。

383. 根据权利要求373-382中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有增加的细胞外囊泡分泌。

384. 根据权利要求373-383中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有改变的细胞外囊泡组成。

385. 根据权利要求384所述的方法, 其中所述改变的细胞外囊泡组成在蛋白质含量、核酸含量、脂质含量或其任何组合方面是改变的。

386. 根据权利要求373-385中任一项所述的方法, 其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述分离的细胞的步骤之前, 将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入所述分离的细胞内的步骤。

387. 根据权利要求373-385中任一项所述的方法, 其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述分离的细胞的步骤之后, 将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入所述分离的细胞内的步骤。

388. 根据权利要求386或387所述的方法, 其中所述异源蛋白质由细胞外囊泡中的细胞分泌。

389. 根据权利要求373-388中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的自噬、减少的线粒体自噬、减少的衰老、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生、减少的细胞炎症、减少的细胞损害、增加的细胞屏障功能、增加的血管生成、增加的细胞粘附、增加的生长动力学或其任何组合。

390. 根据权利要求389所述的方法, 其中所述减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的血色素加氧酶-1(HO-1)表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。

391. 根据权利要求390所述的方法, 其中所述改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。

392. 根据权利要求389所述的方法, 其中所述减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合相关。

393. 根据权利要求389所述的方法, 其中所述减少的细胞凋亡与至少一种促凋亡标记物的表达减少相关。

394. 根据权利要求393所述的方法, 其中所述至少一种促凋亡标记物是BIM、PUMA、BAX、BAK、SMAC、DIABLO、BID、NOXA、BIK或其任何组合。

395. 根据权利要求389所述的方法, 其中所述减少的细胞凋亡与至少一种抗凋亡标记物的表达增加相关。

396. 根据权利要求395所述的方法, 其中所述至少一种抗凋亡标记物是BCL-2、BCL-XL、BCL-W、MCL-1、A1/BFL-1或其任何组合。

397. 根据权利要求373-396中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。

398. 根据权利要求397所述的方法, 其中所述增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加相关。

399. 根据权利要求373-398中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有在二维或三维细胞支持物上的改善的细胞粘附和生长动力学。

400. 根据权利要求399所述的方法, 其中所述二维或三维细胞支持物是微载体。

401. 根据权利要求399或400所述的方法, 其中所述二维或三维细胞支持物包含一种或多种细胞外基质组分。

402. 根据权利要求373-401中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞在冷缺血中维持活力更久。

403. 根据权利要求373-402中任一项所述的方法, 其中所述分离的细胞是分离的人细胞。

404. 一种改善有此需要的受试者中的细胞疗法的方法, 所述方法包括:

(i) 在体外将分离的线粒体递送至分离的细胞, 和

(ii) 将用所述分离的线粒体处理的所述细胞施用于所述受试者。

405. 根据权利要求404所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

406. 根据权利要求404所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者同种异体的分离的人线粒体。

407. 根据权利要求404所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述受试者自体的分离的人线粒体。

408. 根据权利要求404所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

409. 根据权利要求408所述的方法, 其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或

增加的ATP合成。

410. 根据权利要求404-409中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞是上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

411. 根据权利要求410所述的方法,其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

412. 根据权利要求410所述的方法,其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

413. 根据权利要求410所述的方法,其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

414. 根据权利要求410所述的方法,其中所述免疫细胞包含造血细胞。

415. 根据权利要求404-414中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞是同种异体细胞。

416. 根据权利要求404-414中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞是自体细胞。

417. 根据权利要求416所述的方法,其进一步包括在体外将分离的线粒体递送至所述分离的细胞的步骤之前,从所述受试者中分离所述自体细胞的步骤。

418. 根据权利要求404-417中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有增加的细胞外囊泡分泌。

419. 根据权利要求404-418中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有改变的细胞外囊泡组成。

420. 根据权利要求419所述的方法,其中所述改变的细胞外囊泡组成在蛋白质含量、核酸含量、脂质含量或其任何组合方面是改变的。

421. 根据权利要求404-420中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述分离的细胞的步骤之前,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入所述分离的细胞内的步骤。

422. 根据权利要求404-420中任一项所述的方法,其进一步包括在将所述分离的线粒体递送至所述分离的细胞的步骤之后,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入所述分离的细胞内的步骤。

423. 根据权利要求421或422所述的方法,其中所述异源蛋白质由细胞外囊泡中的细胞分泌。

424. 根据权利要求404-423中任一项所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述细胞通过注射施用于所述受试者。

425. 根据权利要求404-423中任一项所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述细胞通过气道施用于所述受试者。

426. 根据权利要求424或425所述的方法,其中将用所述分离的线粒体处理的所述细胞作为微载体的部分施用于所述受试者。

427. 根据权利要求404-426中任一项所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比,所述处理的细胞具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的自噬、减少的线粒体自噬、减少的衰老、减少的线粒体应激信号传导、减少的细胞损害、减少的活性氧产生、减少的细胞炎症、增加的细胞屏障功能、增加的血管生成、增加的细胞粘附、增加的

生长动力学或其任何组合。

428. 根据权利要求427所述的方法, 其中所述减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的血色素加氧酶-1 (HO-1) 表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。

429. 根据权利要求428所述的方法, 其中所述改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。

430. 根据权利要求427所述的方法, 其中所述减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合相关。

431. 根据权利要求427所述的方法, 其中所述减少的细胞凋亡与至少一种促凋亡标记物的表达减少相关。

432. 根据权利要求431所述的方法, 其中所述至少一种促凋亡标记物是BIM、PUMA、BAX、BAK、SMAC、DIABLO、BID、NOXA、BIK或其任何组合。

433. 根据权利要求427所述的方法, 其中所述减少的细胞凋亡与至少一种抗凋亡标记物的表达增加相关。

434. 根据权利要求433所述的方法, 其中所述至少一种抗凋亡标记物是BCL-2、BCL-XL、BCL-W、MCL-1、A1/BFL-1或其任何组合。

435. 根据权利要求404-434中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 所述处理的细胞具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。

436. 根据权利要求435所述的方法, 其中所述增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加相关。

437. 根据权利要求404-436中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有在二维或三维细胞支持物上的改善的细胞粘附和生长动力学。

438. 根据权利要求437所述的方法, 其中所述二维或三维细胞支持物是微载体。

439. 根据权利要求437或438所述的方法, 其中所述二维或三维细胞支持物包含一种或多种细胞外基质组分。

440. 根据权利要求404-439中任一项所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的所述细胞在冷缺血中维持活力更久。

441. 根据权利要求404-440中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人受试者。

442. 一种用于改善分离的细胞的冷运输、冷运送或冷储存的方法, 所述方法包括在冷运输、冷运送或冷储存之前、期间或之后, 将分离的线粒体递送至所述分离的细胞,

其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比, 用所述分离的线粒体处理的细胞具有至少5%的活力改善。

443. 根据权利要求442所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

444. 根据权利要求442所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述细胞同种异体的分离的人线粒体。

445. 根据权利要求442所述的方法, 其中所述分离的线粒体是对于所述细胞自体的分离的人线粒体。

446. 根据权利要求442所述的方法, 其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相

比,用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有减少的ROS介导的氧化副产物产生、改善的细胞活力、减少的坏死、减少的细胞裂解、增加的细胞ATP的总水平、减少的炎性细胞因子分泌或其任何组合。

447. 根据权利要求446所述的方法,其中所述炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。

448. 根据权利要求446所述的方法,其中所述ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

449. 根据权利要求442所述的方法,其中与未用所述分离的线粒体处理的相应细胞相比,用所述分离的线粒体处理的所述细胞具有至少5%的线粒体功能改善。

450. 根据权利要求449所述的方法,其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

451. 根据权利要求442-450中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞是上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

452. 根据权利要求451所述的方法,其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

453. 根据权利要求452所述的方法,其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

454. 根据权利要求452所述的方法,其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

455. 根据权利要求452所述的方法,其中所述免疫细胞包含造血细胞。

456. 根据权利要求442-455中任一项所述的方法,其进一步包括冷冻保存用所述分离的线粒体处理的所述人细胞的步骤。

457. 根据权利要求456所述的方法,其中在冷冻保存所述人细胞的步骤之前、在冷冻保存所述人细胞的步骤期间、在从冷冻保存解冻时或其任何组合,将所述分离的线粒体递送至所述人细胞。

458. 根据权利要求456所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述人细胞通过阶梯式降压液氮冷冻进行冷冻保存。

459. 根据权利要求442-458中任一项所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述细胞维持在包含脂质、蛋白质、糖类、多糖或其任何组合的溶液中。

460. 根据权利要求459所述的方法,其中所述糖类或多糖是单糖、二糖或寡糖。

461. 根据权利要求442-458中任一项所述的方法,其中用所述分离的线粒体处理的所述细胞维持在包含海藻糖、蔗糖、甘油、PlasmaLyte、CryoStor、DMSO、脂质、谷氨酸盐、PEG、PVA、白蛋白或其任何组合的溶液中。

462. 一种用于冷冻保存分离的线粒体的方法,所述方法包括在包含冷冻保护剂的冷冻缓冲液中冷冻分离的线粒体。

463. 根据权利要求462所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

464. 根据权利要求462所述的方法,其中所述分离的线粒体是分离的人线粒体。

465. 根据权利要求462-464中任一项所述的方法,其进一步包括从细胞或组织中分离所述线粒体。

466. 根据权利要求462-465中任一项所述的方法,其中所述冷冻保护剂是脂质、蛋白

质、糖类、二糖、寡糖、多糖或其任何组合。

467. 根据权利要求462-465中任一项所述的方法, 其中所述冷冻保护剂是海藻糖、蔗糖、甘油、PlasmaLyte、CryoStor、DMSO、谷氨酸盐、PEG、PVA、白蛋白或其任何组合。

468. 根据权利要求462-467中任一项所述的方法, 其中所述分离的线粒体通过阶梯式降压液氮冷冻进行冷冻保存。

469. 根据权利要求462-468中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括解冻所述冷冻的分离的线粒体, 并且通过测量以下一项或多项, 来评价所述解冻的分离的线粒体的健康和/或功能: 线粒体肿胀、线粒体膜转换孔 (mPTP) 开口、线粒体呼吸、线粒体膜电位、线粒体完全通透性和线粒体肿胀。

470. 根据权利要求462-468中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括解冻所述冷冻的分离的线粒体, 并且通过对线粒体总体形态进行评分和/或测量平均线粒体大小, 来评价所述解冻的分离的线粒体的健康和/或功能。

471. 一种用于长期储存分离的线粒体的方法, 所述方法包括:

- (i) 从细胞或组织中分离线粒体,
- (ii) 将分离的线粒体悬浮于冷储存缓冲液中,
- (iii) 在约-70°C至约-100°C的温度下, 在冷储存缓冲液中冷冻所述分离的线粒体, 和
- (iv) 将所述冷冻的分离的线粒体在约-70°C至约-100°C的温度下维持24小时或更长时间。

472. 根据权利要求471所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的猪线粒体。

473. 根据权利要求471所述的方法, 其中所述分离的线粒体是分离的人线粒体。

474. 根据权利要求473所述的方法, 其中在所述冷储存缓冲液中的所述分离的线粒体在约-75°C至约-95°C的温度下冷冻, 并且其中所述冷冻的分离的线粒体维持在约-75°C至约-95°C的温度下。

475. 根据权利要求474所述的方法, 其中在所述冷储存缓冲液中的所述分离的线粒体在约-80°C至约-90°C的温度下冷冻, 并且其中所述冷冻的分离的线粒体维持在约-80°C至约-90°C的温度下。

476. 根据权利要求471-475中任一项所述的方法, 其中所述冷储存缓冲液包含海藻糖、蔗糖、甘油、CryoStor或其任何组合。

477. 根据权利要求476所述的方法, 其中所述冷储存缓冲液是等渗的并且具有约7.0至约7.5的pH。

478. 根据权利要求477所述的方法, 其中所述冷储存缓冲液包含海藻糖。

479. 根据权利要求471-478中任一项所述的方法, 其中所述冷冻的分离的线粒体在所述温度下维持1周或更长时间。

480. 根据权利要求471-478中任一项所述的方法, 其中所述冷冻的分离的线粒体在所述温度下维持1个月或更长时间。

481. 根据权利要求471-478中任一项所述的方法, 其中所述冷冻的分离的线粒体在所述温度下维持1年或更长时间。

482. 根据权利要求471-481中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括:

- (v) 解冻所述冷冻的分离的线粒体, 和

(vi) 通过测量以下一项或多项,来评价所述解冻的分离的线粒体的健康和/或功能:线粒体肿胀、线粒体膜转换孔(mPTP)开口、线粒体呼吸、线粒体膜电位、线粒体完全通透性和线粒体肿胀。

483. 根据权利要求471-481中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括:

(v) 解冻所述冷冻的分离的线粒体,

(vi) 通过使用流式细胞术测量线粒体肿胀,来评价所述解冻的分离的线粒体的健康,和

(vii) 使用流式细胞术辅助的细胞分选,使健康的线粒体与具有肿胀表型的线粒体分离。

484. 一种用于检测人细胞、组织或器官样品中的猪线粒体的方法,所述方法包括在体外或离体检测所述人细胞、组织或器官样品中的核酸标记物的存在,其中所述核酸标记物包含线粒体DNA或RNA的序列,并且其中所述核酸标记物存在于猪线粒体中而不存在于人线粒体中。

485. 根据权利要求484所述的方法,其进一步包括通过聚合酶链反应(PCR)扩增所述核酸标记物的步骤。

486. 根据权利要求484或485所述的方法,其中使用引物对通过PCR检测所述核酸标记物的存在,其中所述引物对的至少一个引物与所述核酸标记物特异性杂交。

487. 根据权利要求484或485所述的方法,其中使用与所述核酸标记物特异性杂交的核酸探针检测所述核酸标记物的存在。

488. 根据权利要求484-487中任一项所述的方法,其进一步包括定量所述人细胞、组织或器官样品中的所述核酸标记物的量。

489. 一种包含人细胞的组合物,其中所述人细胞的胞质溶胶包含外源性线粒体,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述组合物的所述人细胞具有至少5%的线粒体功能改善,并且其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

490. 根据权利要求489所述的组合物,其中所述外源性线粒体是猪线粒体。

491. 根据权利要求490所述的组合物,其中所述外源性线粒体衍生自猪心。

492. 根据权利要求489所述的组合物,其中所述外源性线粒体是对于所述人细胞同种异体的人线粒体。

493. 根据权利要求489-492中任一项所述的组合物,其中所述人细胞是上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、祖细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

494. 根据权利要求493所述的组合物,其中所述内皮细胞包含人肺动脉内皮细胞(HPAEC)。

495. 根据权利要求493所述的组合物,其中所述平滑肌细胞包含肺动脉平滑肌细胞。

496. 根据权利要求493所述的组合物,其中所述祖细胞包含内皮祖细胞和/或间充质干细胞。

497. 根据权利要求493所述的组合物,其中所述免疫细胞包含造血细胞。

498. 根据权利要求489-497中任一项所述的组合物,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述人细胞具有增加的细胞外囊泡分泌。

499. 根据权利要求489-498中任一项所述的组合物,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述人细胞具有改变的细胞外囊泡组成。

500. 根据权利要求499所述的组合物,其中所述改变的细胞外囊泡组成在蛋白质含量、核酸含量、脂质含量或其任何组合方面是改变的。

501. 根据权利要求489-500中任一项所述的组合物,其中所述人细胞进一步包含编码至少一种异源蛋白质的转基因。

502. 根据权利要求501所述的组合物,其中所述转基因的转录在所述人细胞的核中发生。

503. 根据权利要求502所述的组合物,其中所述转基因稳定整合到所述人细胞的核DNA中。

504. 根据权利要求502或503所述的组合物,其中所述异源蛋白质由细胞外囊泡中的人细胞分泌。

505. 根据权利要求501所述的组合物,其中所述转基因的转录在所述外源性线粒体中发生。

506. 根据权利要求505所述的组合物,其中所述转基因稳定整合到所述外源性线粒体的线粒体DNA(mtDNA)中。

507. 根据权利要求489-506中任一项所述的组合物,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述人细胞在冷缺血中维持活力更久。

508. 根据权利要求489-507中任一项所述的组合物,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述人细胞具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的自噬、减少的线粒体自噬、减少的衰老、减少的线粒体应激信号传导、减少的细胞损害、减少的活性氧产生、减少的细胞炎症、增加的细胞屏障功能、增加的血管生成、增加的细胞粘附、增加的生长动力学或其任何组合。

509. 根据权利要求508所述的组合物,其中所述减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的血色素加氧酶-1(HO-1)表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。

510. 根据权利要求509所述的组合物,其中所述改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。

511. 根据权利要求508所述的组合物,其中所述减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合相关。

512. 根据权利要求508所述的组合物,其中所述减少的细胞凋亡与至少一种促凋亡标记物的表达减少相关。

513. 根据权利要求512所述的组合物,其中所述至少一种促凋亡标记物是BIM、PUMA、BAX、BAK、SMAC、DIABLO、BID、NOXA、BIK或其任何组合。

514. 根据权利要求508所述的组合物,其中所述减少的细胞凋亡与至少一种抗凋亡标记物的表达增加相关。

515. 根据权利要求514所述的组合物,其中所述至少一种抗凋亡标记物是BCL-2、BCL-XL、BCL-W、MCL-1、A1/BFL-1或其任何组合。

516. 根据权利要求489-515中任一项所述的组合物,其中与缺乏外源性线粒体的相应

人细胞相比,所述人细胞具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。

517. 根据权利要求516所述的组合物,其中所述增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加相关。

518. 根据权利要求489-517中任一项所述的组合物,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述人细胞具有在二维或三维细胞支持物上的改善的细胞粘附和生长动力学。

519. 根据权利要求489-518中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含二维或三维细胞支持物。

520. 根据权利要求519所述的组合物,其中所述二维或三维细胞支持物是微载体。

521. 根据权利要求519或520所述的组合物,其中所述二维或三维细胞支持物包含一种或多种细胞外基质组分。

522. 根据权利要求489-521中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

523. 根据权利要求522所述的组合物,其中所述至少一种药学上可接受的载体或赋形剂选自:呼吸缓冲液、一种或多种细胞外基质组分、器官或组织保存溶液、盐水、水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、一种或多种多元醇和植物油。

524. 根据权利要求489-523中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包含至少一种活性成分。

525. 根据权利要求524所述的组合物,其中所述至少一种活性成分选自:曲前列尼尔、抗氧化剂、UNEX-42和抗炎剂。

移植器官的线粒体处理

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年6月18日提交的美国临时申请号62/863,034的优先权。

发明领域

[0003] 本公开涉及线粒体例如分离的猪线粒体或分离的人线粒体用于改善细胞、组织和器官功能的用途,以及线粒体的治疗用途。

[0004] 发明背景

[0005] 线粒体是真核细胞中的双膜结合的细胞器,其在维持和保存细胞稳态和功能方面发挥关键作用。例如,线粒体提供细胞能量,并且在细胞信号传导、细胞分化、细胞凋亡、细胞周期调控和细胞生长中发挥关键作用。通常,线粒体提供多于90%的细胞的ATP需求。

[0006] 线粒体由线粒体外膜、线粒体内膜、外膜和内膜之间的膜间隙、通过内膜的内折形成的嵴腔、内膜内的基质腔、线粒体相关的ER膜(MAM)、以及基质内的显示与细菌基因组的显著相似性的独立基因组组成。线粒体外膜含有称为孔蛋白的整合膜蛋白(其允许低分子量分子自由扩散穿过膜),以及涉及多种活动(例如脂肪酸的延长、肾上腺素的氧化和色氨酸的降解)的酶。线粒体外膜的破坏导致线粒体蛋白泄漏到胞质溶胶内,其触发通过细胞凋亡的细胞死亡。线粒体内膜是一种高度不可渗透的富含蛋白质的膜,其执行氧化磷酸化的氧化还原反应,并且含有在基质中生成ATP的ATP合酶。

[0007] 线粒体损伤和功能丧失对细胞、组织或器官是有害的,并且已牵涉获得性和遗传性人疾病,包括心功能不全、心力衰竭和自闭症。线粒体功能障碍通过各种机制发生,所述机制包括核或线粒体基因组DNA的遗传改变、缺血、环境危害、促炎细胞因子、由活化的免疫细胞生成的活性氧(ROS)以及与氧化性应激相关的状况。参见例如,Rossignol,D.和R.Frye,Mol Psychiatry 2012,17:389-401;Suematsu,N.等人,Circulation 2003,107:1418-23;和Fernandez-Checa,J.等人,Am J Physiol,1997,273:G7-17,所述参考文献各自以引用方式整体并入本文。例如,已显示了缺血降低线粒体复合物活性、耗氧量、氧化还原酶活性、脂肪酸和葡萄糖代谢以及三磷酸腺苷(ATP)合成,并增加钙积累。参见例如,Faulk,E.等人,Circulation 1995,92:405-12;Black,K.等人,Physiol Genomics 2012,44:1027-41;和Masuzawa,A.等人,Am J Physiol Heart Circ Physiol,2013,304:H966-82,所述参考文献各自以引用方式整体并入本文。由线粒体DNA中的突变引起的疾病包括Leber遗传性视神经病变、MELAS综合征和Kearns-Sayre综合征。

[0008] 由于线粒体在细胞代谢中发挥的关键作用,因此改善线粒体功能可以促进细胞、组织和器官在诸如冷暴露和缺血期间的应激条件下的活力和功能。先前已通过McCully等人(Mitochondrion 2017,34:127-34,其以引用方式整体并入本文)显示了,自体线粒体(即,从患者自身中分离的线粒体)的移植降低了起因于短暂性缺血的心肌损伤。然而,目前不存在已知和批准的治疗方法或疗法,其涉及用外源性线粒体例如猪线粒体或外源性人线粒体(即,从第一人受试者中分离的用于处理第二人受试者的细胞、组织或器官的线粒体)处理细胞、组织或器官。

[0009] 因此,在细胞疗法、移植和器官/组织改造(engineering)领域存在对于外源性线粒体的持续需要,所述外源性线粒体可以从可容易获得的来源获得,并且能够改善细胞、组织或器官的功能和活力。此类外源性线粒体可用于改善器官移植和改造的功效和效率,例如在离体肺灌注(EVLP)期间改善肺功能。此类外源性线粒体还可用于使与缺氧和冷缺血相关的细胞损害和炎症降到最低,所述细胞损害和炎症例如在所收获的器官、组织或细胞的冷储存或运送过程中遭受的细胞损害和炎症。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开涉及线粒体用于改善细胞、组织或器官功能的用途,以及线粒体的治疗用途。线粒体可以从任何合适的来源中分离,所述来源包括但不限于从哺乳动物供体获得的细胞或组织。哺乳动物供体的非限制性实例是人、非人灵长类动物、猪、绵羊、犬科动物、兔、小鼠和大鼠。本公开经常提及猪线粒体的使用,但应当理解可以使用任何合适的线粒体。因此,当本公开而不是权利要求书提及“猪线粒体”时,应理解所述线粒体也可以是来自人或其它非人来源的线粒体。

[0012] 在一些实施方案中,线粒体是外源性线粒体。在一些实施方案中,外源性线粒体相对于靶细胞、组织或器官是异种的。在一些实施方案中,外源性线粒体相对于靶细胞、组织或器官是同种异体的。在一些实施方案中,线粒体是内源性线粒体。在一些实施方案中,线粒体是自体线粒体。在优选的实施方案中,猪线粒体用于处理人细胞、组织或器官。在一些实施方案中,猪线粒体从遗传改造以用于人中的器官移植的猪受试者中分离。在其它优选的实施方案中,从第一人受试者分离的线粒体用于处理来自第二人受试者的人细胞、组织或器官。在一些实施方案中,人线粒体从预期用于(intended for)移植的细胞、组织或器官的供体中分离。在一些实施方案中,人线粒体从细胞、组织或器官移植的受体中分离。在一些实施方案中,人线粒体从细胞、组织或器官移植的预期受体(intended recipient)中分离。在一些实施方案中,人线粒体对于细胞、组织或器官移植的预期受体是同种异体的。在一些实施方案中,人线粒体对于细胞、组织或器官移植的预期受体是自体的。在一些实施方案中,预期用于移植的细胞、组织或器官用对于预期用于移植的细胞、组织或器官同种异体的线粒体进行处理。在一些实施方案中,预期用于移植的细胞、组织或器官用对于预期用于移植的细胞、组织或器官自体的线粒体进行处理。

[0013] 本公开提供器官移植的方法,其包括将分离的线粒体递送至预期用于移植的器官。在另一个实施方案中,本公开提供改善受试者中所植入的组织或所移植的器官的性能的方法,其包括在组织或器官的植入或移植之前、期间或之后,将分离的线粒体递送至组织或器官,其中所述组织或器官是供体组织、供体器官、改造的组织或改造的器官。在另一个实施方案中,本公开提供在离体肺灌注(EVLP)期间改善肺的功能的方法,其包括:(i)将分离的线粒体递送至肺,并且(ii)通过用来自贮库的灌注液对肺进行灌注,在腔室或容器(vessel)中对肺执行EVLP。在另一个实施方案中,本公开提供在运输、运送或储存期间用于使由于冷缺血对离体器官的损害降到最低的方法,其包括:在冷缺血前0-24小时、在冷缺血期间或在冷缺血后0-24小时,将分离的线粒体递送至器官,其中与未用分离的线粒体处理的相应器官的细胞相比,用分离的线粒体处理的器官的细胞具有至少5%的线粒体功能改善,并且其中改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

[0014] 在另一个实施方案中,本公开提供用于改善改造的器官或组织的功能的方法,其

包括：(i) 制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架，(ii) 用填充细胞 (populating cells) 填充 (populate) 在生物反应器、腔室或容器中的器官或组织支架，以产生改造的器官或组织，并且 (iii) 将分离的线粒体递送至改造的器官或组织。在另一个实施方案中，本公开提供用于改善改造的器官或组织的功能的方法，其包括：(i) 制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架，并且 (ii) 用由分离的线粒体处理的填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的器官或组织支架，以产生改造的器官或组织。在另一个实施方案中，本公开提供用于改善改造的器官或组织的功能的方法，其包括：(i) 制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架，(ii) 将分离的线粒体注入器官或组织支架，并且 (iii) 用填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的注入的器官或组织支架，以产生改造的器官或组织。

[0015] 在另一个实施方案中，本公开提供用于改善改造的肺的功能的方法，其包括：(i) 用重新填充细胞 (repopulating cell) 重新填充 (repopulate) 在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肺，以产生改造的肺，并且 (ii) 将分离的线粒体递送至改造的肺。在另一个实施方案中，本公开提供用于改善改造的肺的功能的方法，其包括：(i) 将分离的线粒体递送至重新填充细胞，并且 (ii) 用由分离的线粒体处理的重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肺，以产生改造的肺。

[0016] 在另一个实施方案中，本公开提供用于改善改造的肾的功能的方法，其包括：(i) 用重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肾，以产生改造的肾，并且 (ii) 将分离的线粒体递送至改造的肾。在另一个实施方案中，本公开提供用于改善改造的肾的功能的方法，其包括：(i) 将分离的线粒体递送至重新填充细胞，并且 (ii) 用由分离的线粒体处理的重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肾，以产生改造的肾。

[0017] 在另一个实施方案中，本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法，该方法包括向受试者或供体肺施用药物组合物，所述药物组合物包含已用分离的线粒体预处理的间充质干细胞或内皮祖细胞、或者从间充质干细胞或内皮祖细胞中分离的细胞外囊泡。在另一个实施方案中，本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法，该方法包括向受试者或供体肺施用 (A) 间充质干细胞或内皮祖细胞、或者从间充质干细胞或内皮祖细胞中分离的细胞外囊泡，和 (B) 分离的线粒体，其中 (A) 和 (B) 包含在单一药物组合物或两种分开的药物组合物中。在另一个实施方案中，本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症的方法，其包括：(i) 向受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物，并且 (ii) 施用治疗有效量的用于治疗肺疾病或病症的药物，其中在用于治疗肺疾病或病症的药物施用之前、同时或之后，将组合物施用于受试者。在另一个实施方案中，本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的肺高血压 (pulmonary hypertension) 的方法，其包括：(i) 向受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物，并且 (ii) 施用治疗有效量的曲前列尼尔，其中在曲前列尼尔施用之前、同时或之后，将组合物施用于受试者。

[0018] 在另一个实施方案中，本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法，该方法包括：(i) 向受试者或供

体肺施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,并且(ii)向受试者或供体肺施用治疗有效量的UNEX-42,其中在UNEX-42施用之前、同时或之后,向受试者或供体肺施用组合物。在另一个实施方案中,本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,该方法包括:(i)向受试者或供体肺施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,并且(ii)向受试者或供体肺施用治疗有效量的抗氧化剂,其中在抗氧化剂施用之前、同时或之后,向受试者或供体肺施用组合物。在另一个实施方案中,本公开提供用于治疗受试者中的肺疾病或病症的急性加重的方法,其包括向受试者施用有效量的包含分离的线粒体的组合物用于救援疗法。在另一个实施方案中,本公开提供用于治疗有此需要的受试者中的急性肾损伤的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物。在另一个实施方案中,本公开提供用于治疗处于心脏骤停或经历复苏的受试者的方法,其包括向受试者施用有效量的包含分离的线粒体的组合物,以促进其运输到医疗设施或医学治疗。

[0019] 在另一个实施方案中,本公开提供保存用于运输和移植的组织或器官的方法,其包括将分离的线粒体递送至预期用于运输和移植的组织或器官,其中所述组织或器官从已故供体获得。在另一个实施方案中,本公开提供保存由于创伤性截肢而丢失的肢体或其它身体部位的方法,其包括在肢体或其它身体部位的创伤性截肢之后,将分离的线粒体递送至肢体或其它身体部位。

[0020] 在另一个实施方案中,本公开提供减轻有此需要的受试者中的炎症的方法,其包括:(i)将分离的线粒体递送至来自受试者的分离的造血谱系细胞,并且(ii)将用分离的线粒体处理的造血谱系细胞施用于受试者。

[0021] 在另一个实施方案中,本公开提供改善分离的细胞的细胞功能的方法,其包括将分离的线粒体递送至分离的细胞。

[0022] 在另一个实施方案中,本公开提供改善有此需要的受试者中的细胞疗法的方法,其包括:(i)在体外将分离的线粒体递送至分离的细胞,并且(ii)将用分离的线粒体处理的细胞施用于受试者。

[0023] 在另一个实施方案中,本公开提供用于改善分离的细胞的冷运输、冷运送或冷储存的方法,其包括在冷运输、冷运送或冷储存之前、期间或之后将分离的线粒体递送至分离的细胞,其中与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有至少5%的活力改善。在另一个实施方案中,本公开提供用于冷冻保存分离的线粒体的方法,其包括在包含冷冻保护剂的冷冻缓冲液中冷冻分离的线粒体。在另一个实施方案中,本公开提供用于长期储存分离的线粒体的方法,其包括(i)从细胞或组织中分离线粒体,(ii)将分离的线粒体悬浮于冷储存缓冲液中,(iii)在约-70℃至约-100℃的温度下冷冻分离的线粒体,并且(iv)将冷冻的分离的线粒体在约-70℃至约-100℃的温度下维持24小时或更长时间。储存期可以是至少24小时、至少一周、至少四周、至少三个月、至少六个月、至少9个月或至少1年。

[0024] 在另一个实施方案中,本公开提供用于检测人细胞、组织或器官样品中的猪线粒体的方法,其包括在体外或离体检测人细胞、组织或器官样品中的核酸标记物的存在,其中所述核酸标记物包含线粒体DNA或RNA的序列,并且其中所述核酸标记物存在于猪线粒体中而不存在于人线粒体中。

[0025] 在另一个实施方案中,本公开提供包含人细胞的组合物,其中人细胞的胞质溶胶包含外源性线粒体,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,所述组合物的人细胞具有至少5%的线粒体功能改善,并且其中所述改善的线粒体功能是增加的耗氧量和/或增加的ATP合成。

[0026] 本发明的其它目的和优点根据下述说明书将是明确的。

[0027] 附图简述

[0028] 图1显示:用从猪心中分离的线粒体(即猪线粒体)处理人肺动脉内皮细胞(HPAEC)增加了在急性冷暴露后的耗氧率(OCR)。将HPAEC在4℃下放置6小时。在20μL线粒体悬浮液(含有29个颗粒/细胞的呼吸缓冲液;“+MITO”)或仅20μL呼吸缓冲液(“-MITO”)的存在下,HPAEC在37℃下在常氧下恢复1小时,并在非CO₂培养箱中平衡10分钟。然后使用Seahorse仪,用10μM寡霉素、20μM FCCP和5μM鱼藤酮/抗霉素A(Rot/AA)执行“线粒体应激测试”。与相应的基线、寡霉素处理的、FCCP处理的或Rot/AA处理的“-MITO”HPAEC对照相比,猪线粒体处理增加了在基线时(43.6%增加)、寡霉素处理的HPAEC(204.9%增加)、FCCP处理的HPAEC(8.4%增加)和Rot/AA处理的HPAEC(34.1%增加)的OCR。所执行的统计分析是双尾t检验(*p<0.05;**p<0.01)。

[0029] 图2显示:人肺动脉内皮细胞(HPAEC)的猪线粒体处理增加了在慢性冷暴露后的OCR。将HPAEC在4℃下放置12小时。在20μL线粒体悬浮液(含有172个颗粒/细胞的呼吸缓冲液;“+MITO”)或仅20μL呼吸缓冲液(“-MITO”)的存在下,HPAEC在37℃下在常氧下恢复1小时,并在非CO₂培养箱中平衡50分钟。使HPAEC在37℃下在非CO₂条件下的Seahorse仪中静置。然后使用Seahorse仪,用10μM寡霉素、20μM FCCP和5μM鱼藤酮/抗霉素A(Rot/AA)执行“线粒体应激测试”。与相应的基线、寡霉素处理的、FCCP处理的或Rot/AA处理的“-MITO”HPAEC对照相比,猪线粒体处理增加了在基线时(32.4%增加)、寡霉素处理的HPAEC(51.9%增加)、FCCP处理的HPAEC(9.5%增加)和Rot/AA处理的HPAEC(45.2%增加)的OCR。所执行的统计分析是双尾t检验(**p<0.01)。

[0030] 图3显示:暴露于冷应激的HPAEC吸收猪线粒体。将猪线粒体施用于经历冷应激的HPAEC。对于冷恢复组,在冷应激下的HPAEC以剂量依赖性方式吸收猪线粒体,并且猪MtND5的最大表达在1,666个颗粒/细胞时达到。在冷恢复条件下,猪MtND5的最大表达在24小时达到,其中与未处理的冷恢复对照相比,观察到猪MtND5的26,201%增加。在冷暴露条件下,猪MtND5的最大表达在72小时达到,其中与未处理的冷暴露对照相比,观察到MtND5的301,932%增加。所执行的统计分析是单因素ANOVA(*P<0.05,24小时,与常氧相比;#P<0.05,48小时,与常氧相比;+P<0.05,72小时,与常氧相比;\$P<0.05,24小时,与冷对照相比;^P<0.05,48小时,与冷对照相比;&P<0.05,72小时,与冷对照相比)。

[0031] 图4显示:在暴露于冷应激的HPAEC中的人线粒体DNA的转录在很大程度上不受猪线粒体处理的影响。与常温对照相比,在冷恢复条件下的未处理的对照HPAEC证实了人MtND5表达的55%增加。这种增加通过猪线粒体处理得到缓和,其中1个颗粒/细胞证实了与未经处理的常温HPAEC相比3.8%的表达减少,且与未经处理的冷恢复对照相比33%的表达减少。在冷暴露组中,人MtND5的最大表达在72小时达到,但这种增加不受猪线粒体处理的显著影响。所执行的统计分析是单因素ANOVA(*P<0.05,24小时,与常氧相比;#P<0.05,48小时,与常氧相比;+P<0.05,72小时,与常氧相比;\$P<0.05,24小时,与冷对照相比;^P<0.05,

48小时,与冷对照相比; $\&P<0.05$,72小时,与冷对照相比)。

[0032] 图5显示:HPAEC的猪线粒体处理减少了在24小时的冷恢复中的NF- κ B表达。在冷恢复条件下,与常温对照相比,未经处理的对照HPAEC证实了在24小时NF- κ B基因表达的83%增加。与未经处理的冷恢复对照HPAEC相比,猪线粒体处理趋于降低NF- κ B表达,其中与未经处理的冷恢复对照HPAEC相比,1个颗粒/细胞证实了22%降低。在冷暴露条件下,NF- κ B表达的轻微增加在用猪线粒体处理的HPAEC中在24小时发生,但这种增加并非统计学显著的。所执行的统计分析是单因素ANOVA ($*P<0.05$,24小时,与常氧相比; $\#P<0.05$,48小时,与常氧相比; $+P<0.05$,72小时,与常氧相比; $\$P<0.05$,24小时,与冷对照相比; $\wedge P<0.05$,48小时,与冷对照相比; $\&P<0.05$,72小时,与冷对照相比)。

[0033] 图6显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在24小时后的冷恢复中的tol1样受体-9 (TLR-9) 表达。将HPAEC处理,在冷恢复或冷暴露条件下培养,并在24小时、48小时或72小时的时间点收获。在冷恢复条件下,与常温对照相比,未处理的对照HPAEC证实了在24小时TLR-9表达的101%增加。与未处理的冷恢复对照HPAEC相比,猪线粒体处理趋于降低TLR-9表达,其中与未处理的冷恢复对照HPAEC相比,166个颗粒/细胞证实了37%降低。在冷暴露条件下,TLR-9的最大表达在用1个颗粒/细胞处理的HPAEC中发生,其中与未处理的冷暴露对照HPAEC相比,观察到TLR-9表达的60%增加。所执行的统计分析是单因素ANOVA ($*P<0.05$,24小时,与常氧相比; $\#P<0.05$,48小时,与常氧相比; $+P<0.05$,72小时,与常氧相比; $\$P<0.05$,24小时,与冷对照相比; $\wedge P<0.05$,48小时,与冷对照相比; $\&P<0.05$,72小时,与冷对照相比)。

[0034] 图7显示:HPAEC的猪线粒体处理影响了在24小时的冷暴露中的血红素加氧酶-1 (HO-1) 表达。猪线粒体处理增加了在冷暴露条件下的HO-1表达。猪线粒体处理在16个颗粒/细胞时最有效,其中与未处理的冷暴露对照HPAEC相比,可见HO-1表达的24%增加(与未处理的常温对照HPAEC相比242%的增加)。所执行的统计分析是单因素ANOVA ($*P<0.05$,24小时,与常氧相比; $\#P<0.05$,48小时,与常氧相比; $+P<0.05$,72小时,与常氧相比; $\$P<0.05$,24小时,与冷对照相比; $\wedge P<0.05$,48小时,与冷对照相比; $\&P<0.05$,72小时,与冷对照相比)。

[0035] 图8显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,M-CSF分泌在48小时减少了65%。所执行的统计分析是单因素ANOVA ($*P<0.05$,24小时,与常氧相比; $\#P<0.05$,48小时,与常氧相比; $+P<0.05$,72小时,与常氧相比; $\$P<0.05$,24小时,与缺氧对照相比; $\wedge P<0.05$,48小时,与缺氧对照相比; $\&P<0.05$,72小时,与缺氧对照相比)。

[0036] 图9显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的巨噬细胞炎症蛋白-1 β (MIP-1 β) 分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效地减少MIP-1 β 分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,MIP-1 β 分泌在48小时减少了73%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。所执行的统计分析是单因素ANOVA ($*P<0.05$,24小时,与常氧相比; $\#P<0.05$,48小时,与常氧相比; $+P<0.05$,72小时,与常氧相比; $\$P<0.05$,24小时,与缺氧对照相比; $\wedge P<0.05$,48小时,与缺氧对照相比; $\&P<0.05$,72小时,与缺氧对照相比)。

[0037] 图10显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB) 分泌。猪线粒体处理在36个颗粒/细胞时最有效地减少PDGF-BB分泌,其中与未处

理的缺氧对照HPAEC相比,PDGF-BB分泌在48小时减少了69%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0038] 图11显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的RANTES (CCL5) 分泌。猪线粒体处理在0.3个颗粒/细胞时最有效地减少RANTES分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,RANTES分泌在48小时减少了59%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0039] 图12显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的细胞内粘附分子-1 (ICAM-1) 分泌。猪线粒体处理在0.3个颗粒/细胞时最有效地减少ICAM-1分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,ICAM-1分泌在48小时减少了82%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0040] 图13显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的脑源性神经营养因子 (BDNF) 分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效地减少BDNF分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,BDNF分泌在48小时减少了85%。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0041] 图14显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的白细胞介素-1 β (IL-1 β) 分泌。猪线粒体处理在368个颗粒/细胞时最有效地减少IL-1 β 分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,IL-1 β 分泌在48小时减少了70%。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0042] 图15显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的生长/分化因子15 (GDF15) 分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效地减少GDF15分泌,其中与未经处理的缺氧对照HPAEC相比,GDF15分泌在48小时减少了70%。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0043] 图16显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的白细胞介素6 (IL-6) 分泌。猪线粒体处理在368个颗粒/细胞时最有效地减少IL-6分泌,其中与未经处理的缺氧对照HPAEC相比,IL-6分泌在48小时减少了70%。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

氧对照相比)。

[0044] 图17显示:HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 分泌。猪线粒体处理在36个颗粒/细胞时最有效地减少TGF- β 1分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,TGF- β 1分泌在48小时减少了95%。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0045] 图18显示:暴露于缺氧应激的HPAEC吸收猪线粒体。对于缺氧恢复组,在猪线粒体处理之前,将HPAEC在常氧下培养24小时,然后在缺氧(1% O_2)下培养24小时。在猪线粒体处理后,将缺氧恢复的细胞放回常氧下。在常氧下培养24、28或72小时后,收获缺氧恢复的HPAEC。对于缺氧暴露组,将HPAEC在常氧下培养48小时,用猪线粒体处理,并立即置于缺氧(1% O_2)下。在缺氧暴露24、28或72小时后,收获缺氧暴露的HPAEC。如使用对于猪MtND5特异性的探针确定的,在缺氧应激下的HPAEC以剂量依赖性方式吸收猪线粒体,并且在1,666个颗粒/细胞时达到猪MtND5的最大表达。在缺氧恢复条件下,猪MtND5的最大表达在48小时达到,其中与未处理的缺氧恢复对照相比,观察到猪mtND5的4,655%增加。在缺氧暴露条件下,最大表达在24小时达到,其中与未经处理的缺氧暴露对照相比,观察到猪mtND5的26,680%增加。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0046] 图19显示:在暴露于缺氧应激的HPAEC中的人线粒体DNA的转录在很大程度上不受猪线粒体处理的影响。如使用对于人MtND5特异性的探针确定的,对于缺氧恢复组和缺氧暴露组两者,人MtND5的最大表达均在72小时发生。看起来受猪线粒体处理影响的时间点在24小时出现。在缺氧恢复组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的人MtND5表达降低的趋势,其中与未处理的缺氧对照相比,1个颗粒/细胞证实在24小时33%的表达减少。在缺氧暴露组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的人MtND5表达增加的趋势,其中与未处理的缺氧暴露细胞相比,1,666个颗粒/细胞导致在24小时36%的增加。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0047] 图20显示:HPAEC的猪线粒体处理减少了在缺氧恢复中的TLR-9表达,但增加了在24小时的缺氧暴露中的TLR-9表达。对于缺氧恢复组和缺氧暴露组两者,TLR-9的最大表达在24小时发生。在缺氧恢复组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的TLR-9表达降低的趋势,其中与未处理的缺氧对照相比,1个颗粒/细胞证实在24小时38%的表达减少。在缺氧暴露组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的TLR9表达增加的趋势,其中与未处理的缺氧暴露细胞相比,1,666个颗粒/细胞导致在24小时32%的增加。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比;# $P < 0.05$, 48小时,与常氧相比;+ $P < 0.05$, 72小时,与常氧相比;\$ $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比;^ $P < 0.05$, 48小时,与缺氧对照相比;& $P < 0.05$, 72小时,与缺氧对照相比)。

[0048] 图21显示:经历缺氧应激的HPAEC的猪线粒体处理减少了白细胞介素8 (IL-8;

CXCL8)、IL-6、BH3相互作用域死亡激动剂(BID)、人MtND1和人线粒体细胞色素B(Mt-CyB)的mRNA表达。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在3,687个颗粒/细胞时对于减少IL-8表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见IL-8表达的58%降低(图21A)。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时对于减少IL-6表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见IL-6表达的30%降低(图21B)。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在36个颗粒/细胞时对于减少BID表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见BID表达的30%降低(图21C)。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时对于减少人MtND1表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见MtND1表达的57%降低(图21D)。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在0.3个颗粒/细胞时对于减少人Mt-CyB表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见MtCyB表达的57%降低(图21E)。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$, 24小时,与常氧相比; $P < 0.05$, 24小时,与缺氧对照相比)。

[0049] 图22显示:用猪线粒体处理人内皮细胞降低了缺氧诱导的细胞增殖,如通过线粒体处理的HPAEC的总细胞蛋白质含量的降低所指示的。HPAEC用0、5、6或7个猪线粒体/细胞进行处理,并经受缺氧条件24小时。在暴露于缺氧24小时后,经由对HPAEC裂解物的二辛可宁酸(BCA)测定,对于每个样品测量总细胞蛋白质含量。所执行的统计分析是单因素ANOVA (* $P < 0.05$,与未用猪线粒体处理的对照HPAEC相比)。

[0050] 图23显示:人肺泡上皮II型(AT2)细胞的猪线粒体处理改善了AT2细胞的核酸含量。AT2细胞直接从含有和不含猪线粒体的低温储存进行接种,并在标准培养箱中温育过夜。在温育过夜之后,与未处理的AT2细胞对照相比,用猪线粒体处理的AT2细胞的核酸含量增加了23%。

[0051] 图24显示:以各种浓度的分离的猪线粒体在含有二磷酸腺苷(ADP)的呼吸缓冲液中的线粒体活性。

[0052] 图25显示:猪线粒体在 -80°C 下的冷储存后保留线粒体活性。虽然线粒体活性在 4°C 下随着时间过去降低,但在 -80°C 下的储存导致大约40%OCR(线粒体活性)的保留。在海藻糖中的储存改善了OCR,导致原始OCR率的大约60%保留。

[0053] 图26显示:在处于离体肺灌注(EVLP)时,猪线粒体处理改善了分离的猪尸体肺的功能。与右肺对照相比,注射到左肺内的分离的猪线粒体增加了下肺(图26A)、上肺(图26B)和中肺(图26C)中的增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞,如通过组织学测量的(图26A)。猪线粒体处理在24小时在下肺中最有效(图26A),其中与对照(箭头)相比,在猪线粒体处理的细胞中可见50%的改善。

[0054] 图27显示:在处于EVLP时,猪线粒体处理改善了分离的猪尸体肺的潮气量(图27A)和动态压缩(图27B)参数。将分离的猪线粒体注射到处于EVLP的分离的猪尸体肺内,并在肺继续膨胀的同时将灌注关闭10分钟。在注射后10分钟、注射后1小时和注射后4小时,确定潮气量(ml)和动态压缩(TV/(PIP-PEEP))(TV=潮气量;PIP=吸气峰压;PEEP=呼气末正压)。基线潮气量和动态压缩分别代表注射前的潮气量和动态压缩。与基线相比,在注射后10分钟可见潮气量的30%改善和动态压缩的40%增加。

[0055] 图28显示:在分离的猪线粒体注射到处于EVLP的分离的猪尸体肺内之后,存在培养基葡萄糖的立即和进行性下降、以及在注射后一小时循环铵的17%降低。在EVLP开始后24分钟,处于EVLP的分离的猪尸体肺用分离的猪线粒体进行注射,并且在EVLP下维持大约

20小时。使用BioPat (图28A) 和Nova (图28B) 定量循环培养基中的葡萄糖(g/L), 并且使用Nova (图28C) 定量循环铵(NH_4^+ ; mmol/L)。初始Nova葡萄糖和铵水平代表在EVLV之后的时间0的Nova葡萄糖和铵水平。基线Nova葡萄糖和铵水平代表紧在猪线粒体注射之前的Nova葡萄糖和铵水平。

[0056] 图29显示: 与用呼吸缓冲液注射的处于EVLV的猪尸体肺(“对照”)相比, 将分离的猪线粒体注射到处于EVLV的猪尸体肺内(“+Mito”)增加了潮气量(mL/kg; 图29A) 和气体交换($\Delta \text{PO}_2/\text{FiO}_2$; 图29B)。

[0057] 图30显示: 与用呼吸缓冲液注射的处于EVLV的猪尸体肺(“对照”)相比, 将分离的猪线粒体注射到处于EVLV的猪尸体肺内(“+MITO”)降低了循环乳酸盐(circulating lactate)的量(mg/ml; 图30A), 导致葡萄糖/乳酸盐比(glucose/lactate ratio)增加(图30B)。

[0058] 图31显示: 与用呼吸缓冲液注射的猪尸体肺(“对照”)相比, 将分离的猪线粒体注射到处于EVLV的猪尸体肺内(“+MITO”)降低了凋亡细胞的百分比(%TUNEL; 图31A), 并增加了细胞粘附分子CD31的表达(图31B)。凋亡细胞的百分比通过TUNEL测定对EVLV期间取自猪尸体肺的组织活组织检查进行确定。CD31表达通过用抗CD31抗体免疫荧光染色组织活组织检查进行确定。

[0059] 图32显示: 通过测量线粒体的大小和复杂度、线粒体膜通透性转换孔(mPTP) 开口或线粒体呼吸的变化, 可以快速评价分离的线粒体的健康和功能。使用流式细胞术测量健康的和受损的线粒体的大小和复杂度。与健康的线粒体相比, 受损的线粒体更大且更不复杂, 其指示了线粒体肿胀表型(图32A)。使用流式细胞术测量钙黄绿素乙酰氧基甲基(AM) 染色的线粒体的绿色荧光(FITC) 发射来评价mPTP开口。如果线粒体保留钙黄绿素-AM, 则它们被视为具有受调控的mPTP, 导致FITC+染色。如果线粒体不能保留钙黄绿素-AM, 则它们被视为具有失调的、连续的mPTP开口, 导致FITC染色减少。与健康的线粒体相比, 受损的线粒体由于其无法保留钙黄绿素AM而具有急剧减少的FITC发射(图32B)。为了评估线粒体呼吸, 使用Seahorse仪来确定呼吸控制率(RCR)。RCR由在ADP刺激的呼吸(RCR) 和解偶联的呼吸(RCRmax) 期间的耗氧率(OCR) 进行计算。在这两种状态各自的期间的OCR除以基础OCR, 以获得OCR比。通过注射线粒体质子载体解偶联剂BAM15来达到最大呼吸。与健康的线粒体相比, 受损的线粒体具有显著减少的ADP刺激的呼吸率和解偶联的呼吸率(图32C)。

[0060] 图33显示: 通过测量线粒体膜电位或线粒体膜通透性, 可以快速评价分离的线粒体的健康和功能。使用JC-1测定通过流式细胞术评价线粒体膜电位的变化。线粒体去极化通过红色: 绿色荧光强度比的降低或藻红蛋白(PE) 通道中的信号强度降低进行指示。与健康的线粒体相比, 受损的线粒体具有降低的红色: 绿色比和急剧减少的PE发射(图33A)。线粒体通透性通过流式细胞术使用SYTOX绿核酸染剂进行测量, 所述染剂易于渗透具有受损膜的线粒体。用SYTOX绿染色的受损的线粒体将具有比用SYTOX绿染色的未受损的线粒体更高的FITC信号强度。与健康的线粒体相比, 受损的线粒体证实增加的FITC发射(图33B)。

[0061] 图34显示: 线粒体在 -80°C 下的冷储存后保留了线粒体功能, 如通过线粒体大小、复杂度、mPTP开口和呼吸测量的。使用流式细胞术测量线粒体的大小和复杂度, 来评价线粒体肿胀的存在或不存在, 所述线粒体储存在非保存条件(即在 4°C 下储存) 或保存条件(即在 -80°C 下储存) 下。虽然储存在 4°C 下的线粒体几乎立即展示肿胀表型(即大小增加、复杂

度降低),但储存在 -80°C 下的线粒体在储存期间(长达7个月)自始至终保留了与新鲜分离的线粒体可比较的正常表型(图34A)。使用流式细胞术测量钙黄绿素AM染色的线粒体的FITC发射来评价线粒体mPTP开口,所述线粒体储存在非保存条件或保存条件下。如果线粒体保留钙黄绿素-AM,则它们被视为维持mPTP,导致FITC+染色。如果线粒体不能保留钙黄绿素-AM,则它们被视为未能维持mPTP开口,导致FITC染色减少。虽然储存在 4°C 下的线粒体失去了调控其mPTP开口的能力,但储存在 -80°C 下的线粒体在储存期间(长达7个月)自始至终控制与新鲜分离的线粒体可比较的mPTP开口(图34B)。为了评估在非保存条件或保存条件下储存的线粒体的线粒体呼吸,使用Seahorse仪来确定RCR。RCR由在ADP刺激的RCR和解偶联的呼吸(RCR_{max})期间的OCR进行计算。在这两种状态各自的期间的OCR除以基础OCR,以获得OCR比。通过注射线粒体质子载体解偶联剂BAM15来达到最大呼吸。储存在 4°C 下的线粒体的ADP刺激的呼吸率和解偶联的呼吸率随着时间过去下降,而储存在 -80°C 下的线粒体在储存期间(长达6周)自始至终具有与新鲜分离的线粒体可比较的ADP刺激的呼吸率(图34C)和解偶联的呼吸率(图34D)。

[0062] 图35显示:线粒体在 -80°C 下的冷储存后保留了线粒体功能,如通过线粒体膜电位和线粒体膜通透性测量的。使用JC-1测定通过流式细胞术评价线粒体的线粒体膜电位的变化,所述线粒体储存在非保存条件(即在 4°C 下储存)或保存条件(即在 -80°C 下储存)下。线粒体去极化通过红色:绿色荧光强度比的降低或藻红蛋白(PE)通道中的信号强度降低进行指示。虽然储存在 4°C 下的线粒体显示膜电位的急剧减少,但储存在 -80°C 下的线粒体在期间(长达7个月)自始至终保留了与新鲜分离的线粒体可比较的膜电位(图35A)。在非保存条件或保存条件下储存的线粒体的通透性通过流式细胞术使用SYTOX绿核酸染剂进行测量,所述染剂易于渗透具有受损膜的线粒体。用SYTOX绿染色的受损的线粒体将具有比用SYTOX绿染色的未受损的线粒体更高的FITC信号强度。虽然储存在 4°C 下的线粒体具有FITC发射的立即增加,但储存在 -80°C 下的线粒体在整个储存期间(长达7个月)保留了与新鲜分离的线粒体可比较的膜电位(图35B)。

[0063] 图36显示:线粒体在 -80°C 下的冷储存后保留了线粒体功能,如通过其减少HPAEC中的活性氧(ROS)介导的趋化因子分泌的能力测量的。HPAEC与 $25\mu\text{M}$ 甲萘醌(Menadione)一起培养,伴随或不伴随线粒体处理。这些实验中使用的线粒体储存在非保存条件(即在 4°C 下储存)或保存条件(即在 -80°C 下储存)下。使用基于珠的免疫测定来测量处理的HPAEC的培养基中的趋化因子。与保留了减少趋化因子分泌的能力的储存在 -80°C 下的线粒体相比,储存在 4°C 下的线粒体快速失去了其调节IL-8/CXCL8(图36A)、MIG/CXCL9(图36B)、MCP-1/CCL2(图36C)和GR0 α /CXCL1(图36D)分泌的能力。

[0064] 图37显示:储存在 -80°C 下的线粒体具有与新鲜分离的线粒体相同的总体形态(图37A)和平均大小(图37B)。评分为I类(Class I)的线粒体具有浓缩的正常状态(即未受损状态),其由邻接的电子致密基质腔中的许多狭窄的多形嵴代表。评分为II类(Class II)的线粒体处于以重新组构的嵴和基质腔为特征的重塑状态。重塑状态的出现与来自膜间隙的细胞色素c的重新分布和可用性在时间上相关联。评分为III类(Class III)的线粒体是肿胀且受损的。III类线粒体具有完整的膜,但这些线粒体的嵴已退化并接近于线粒体周边聚集。评分为IV类(Class IV)的线粒体最终肿胀或破裂。IV类线粒体显示总体形态紊乱,包括基质的不对称起泡。评分为“浓缩基质(CM)”的线粒体具有浓缩基质,没有限制性外膜。

[0065] 图38显示:完整的线粒体是线粒体处理中的功能组分,与在-80℃下储存后从线粒体中释放的组分或从分离过程中遗留下来的组分形成对比。通过离心从在-80℃下储存两周的线粒体获得线粒体级分和非线粒体级分。HPAEC与25μM甲萘醌一起培养,并用线粒体级分或非线粒体级分进行体积处理。0.02%、0.2%、2%和20%的体积分别对应于1个线粒体/细胞、10个线粒体/细胞、100个线粒体/细胞和1000个线粒体/细胞。分析的参数包括炎症趋化因子IL-8/CXCL8(图38A)、MCP-1/CCL-2(图38B)和GROα/CXCL-1(图38C)的分泌,以及乳酸脱氢酶(LDH)的释放(图38D),其指示了细胞损害。单独的线粒体级分保留了减少趋化因子分泌和LDH释放的能力。

[0066] 图39显示:在缺血/再灌注(I/R)小鼠模型中,猪线粒体处理改善了在急性肾损伤后的体内肾功能和恢复。通过夹住肾动脉45分钟随后为再灌注,在成年小鼠中实现了急性I/R损伤。在第1天时,在再灌注后,小鼠用线粒体(0.01x或0.1x)或媒介物对照进行注射。其为肾功能指标的血尿素氮(BUN)在I/R损伤后增加,并在线粒体注射(0.1x)后的第2天和第4天时趋于降低(图39A)。其为由肾占据的小鼠重量百分比的肾指数在I/R损伤后增加,并在线粒体注射(0.01x)后减少(图39B)。肾损伤分子-1(KIM1)是急性肾损伤的标记物。虽然I/R损伤增加了KIM1血清水平,但线粒体处理以剂量响应方式减少了这些水平(图39C)。单核细胞趋化蛋白1(MCP1)是与急性肾损伤相关的促炎细胞因子。虽然I/R损伤增加了MCP1血清水平,但线粒体处理以剂量响应方式减少了这些水平(图39D)。补体系统的C3a和C5a成员在缺氧/复氧后诱导来自肾小管上皮细胞和巨噬细胞两者的炎症介质。虽然I/R损伤增加了C3a(图39E)和C5a(图39F)血清水平,但线粒体处理以剂量依赖性方式减少了这些水平(图39E-F)。这些研究中使用的线粒体在注射之前在-80℃下储存了大约1个月。所执行的统计分析是单因素ANOVA($\#P \leq 0.05$,与假手术相比; $*P \leq 0.05$,与模型+媒介物相比)。

[0067] 图40显示:在冷缺血损伤之后置于EVLV下的分离的猪尸体肺中,猪线粒体处理改善了间隙连接标记物的表达并减少了DNA氧化。在大约20小时的冷缺血时间后,对分离的猪尸体肺运行EVLV。在1小时后在上叶中以及在4小时后在尾叶远段、尾叶近段和上叶中测量时,线粒体处理改善了EVLV中的间隙连接标记物连接粘附分子1(JAM1)(图40A)和CD31(图40B)表达。8-羟基-2'-脱氧鸟苷(8-OHdG)是ROS诱导的DNA氧化的标记物。在1小时后在上叶中以及在4小时后在尾叶远段、尾叶近段、下叶和上叶中测量时,线粒体处理降低了在EVLV期间的肺组织中的8-OHdG表达(图40C)。蛋白质表达归一化于DAPI核染色,并且所有数据都归一化至基线EVLV前组织。所执行的统计分析是双尾T检验。

[0068] 图41显示:在冷缺血损伤之后的分离的猪尸体肺中,猪线粒体处理减少了IL-6、IL-8和干扰素(IFN)- γ 表达或分泌。在冷缺血时间大约20小时后,对分离的猪尸体肺运行EVLV。在1小时EVLV后的上叶中以及在4小时EVLV后的尾叶远段、尾叶近段和上叶中,线粒体处理降低了在EVLV期间的循环IL-6(图41A),并降低了肺组织裂解物的IL-8水平(图41B)。

[0069] 图42显示:在EVLV期间,线粒体注射对肺血管阻力(PVR)的作用。在EVLV期间,测量分离的猪尸体肺的PVR。在分析中包括了在3小时的EVLV时间用媒介物进行处理的6个肺(“对照”)、以及在3小时的EVLV时间用线粒体进行处理的5个肺(“线粒体”)(图42A)。图42B中显示了单个线粒体处理的肺,以证实线粒体注射可以如何在3小时注射时肉眼可见。图42A和图42B中的虚线代表线粒体注射的时间。图42B中的箭头代表在其下评价气体交换的时间。在每次评价之间是募集事件。所执行的统计分析是单因素ANOVA($\#P \leq 0.01$,与对照相

比; * $P \leq 0.05$, 与对照相比)。

[0070] 图43显示:通过在冷缺血损伤之后置于EVLV下的分离的猪尸体肺的线粒体处理影响的途径。使分离的猪尸体肺暴露于大约20小时的冷缺血时间,这之后对肺运行EVLV 5小时。从对照缓冲液注射的肺或线粒体注射的肺中收集远尾端和近尾端肺组织,并经受RNA测序。相对于对照样品,线粒体处理降低了炎症和凋亡途径。

[0071] 图44显示:线粒体处理减少了ROS介导的氧化副产物和ROS介导的趋化因子分泌。HPAEC与25 μ M的ROS诱导剂甲萘醌一起培养5小时,伴随或不伴随线粒体处理。通过竞争性ELISA在处理细胞的裂解物中测量氧化性应激标记物4-羟基壬烯醛(4-HNE)和8-OHdG。线粒体处理有效地将4-HNE加合物(图44A)和8-OHdG(图44B)的水平减少至正常(无甲萘醌处理)水平。通过流式细胞术就分泌的趋化因子的存在分析处理细胞的细胞培养物上清液。线粒体处理有效地将IL-8/CXCL8(图44C)、MCP1/CCL2(图44D)、MIG/CXCL9(图44E)和GRO α /CXCL1的分泌减少至正常(无甲萘醌处理)水平。用于这些实验的线粒体在使用之前在-80 $^{\circ}$ C下储存1周。所执行的统计分析是单因素ANOVA (** $P < 0.0001$, 与未处理的25 μ M甲萘醌相比; **** $P < 0.0001$, 与未处理的25 μ M甲萘醌相比)。

[0072] 图45显示:线粒体处理减少了ROS介导的损害并改善了经受冷/复温损伤的HPAEC的活力。为了在二维(2D)培养模型中复制冷/复温损伤,HPAEC在4 $^{\circ}$ C下培养24小时(低温条件)并在37 $^{\circ}$ C下复温4小时(常温条件),如图45A中所示。处理组包括在低温开始时用线粒体处理的HPAEC和在复温时用线粒体处理的HPAEC。在4小时的复温期后,使用4-HNE加合物竞争性ELISA定量HPAEC裂解物中的4-HNE蛋白加合物来测量ROS介导的损害。4-HNE加合物形成对于线粒体处理非常敏感,因为非常低剂量的线粒体能够具有影响(图45B)。在4小时的复温期后还测量了细胞活力。结果在图45C中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)的相对光单位(RLU)。正常、无应激的HPAEC由虚线表示(图45C)。与未处理的HPAEC相比,线粒体处理产生了细胞活力的2-3倍增加(图45C)。

[0073] 图46显示:线粒体处理减少了经受冷/复温损伤的HPAEC的坏死。使用图45A中所示的2D培养方法复制冷/复温损伤。处理组包括在低温开始时用线粒体处理的HPAEC和在复温时用线粒体处理的HPAEC。在4小时的复温期后,使用细胞不可渗透的促荧光(profluorescent)DNA染料测量坏死性细胞死亡。结果在图46A中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)的相对光单位(RLU)。用线粒体处理的HPAEC显示坏死的剂量依赖性降低(图46A)。坏死性细胞死亡的一个标志是混合谱系激酶结构域如假激酶(MLKL)的磷酸化。使用夹心ELISA测量磷酸化MLKL(pMLKL)和总MLKL,来分析在4小时升温期后收集的HPAEC裂解物。结果在图46B中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)的在450nm波长下测量的光密度(OD_{450})。用线粒体处理的HPAEC显示pMLKL水平的剂量依赖性降低(图46B)。总MLKL水平没有变化(数据未显示)。高迁移率族蛋白B1(High Mobility Group Box 1)(HMGB-1)是一种由经历坏死的细胞被动释放的遍在核蛋白。通过夹心ELISA测量HPAEC培养物上清液中释放的HMGB-1。图46C中显示的结果归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)。与未处理的细胞相比,线粒体处理减少了HMGB-1释放(图46C)。乳酸脱氢酶(LDH)是一种在细胞裂解时释放的稳定的胞质酶。HPAEC培养物上清液中释放的LDH用30分钟偶联酶促测定进行测量,所述测定导致四唑盐(INT)转换成红色甲臢产物。结果在图46D中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有

线粒体处理的HPAEC)的在490nm波长下测量的光密度(OD_{490})。与未处理的细胞相比,线粒体处理减少了LDH释放(图46D)。正常的、无应激的HPAEC对照在图46A、46B和46D中由虚线表示。

[0074] 图47显示:线粒体处理增加了经受冷/复温损伤的HPAEC中的细胞ATP的总水平,其与改善的细胞活力相关联。使用图45A中所示的2D培养方法复制冷/复温损伤。处理组包括在低温开始时用线粒体处理的HPAEC和在复温时用线粒体处理的HPAEC。在4小时的复温期后,使用发光ATP检测测定来测量细胞ATP的总水平。图47A中显示的结果归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)。与未处理的细胞相比,线粒体处理的HPAEC具有增加的ATP浓度。在增加的ATP浓度和细胞活力之间存在正相关(图47B),并且在增加的ATP浓度和坏死之间存在负相关(图47C)。所执行的统计分析是单因素ANOVA。

[0075] 图48显示:线粒体处理改善了细胞活力并减少了肺匀浆中的坏死。在冷储存中的24小时后,收集肺的远端碎片,进行酶促消化,并置于常温(复温)细胞培养条件下。线粒体处理(500个颗粒/mg或1,000个颗粒/mg)基于湿组织重量。与未处理的肺匀浆相比,线粒体处理显著改善了细胞活力(图48A)并减少了坏死(图48B)。所执行的统计分析是单因素ANOVA(**** $P < 0.0001$,与未处理的相比)。

[0076] 图49显示:线粒体处理减少了通过肺匀浆的IL-6和IFN- γ 分泌。在4°C下过夜储存后,将肺组织匀浆化,用增加剂量的线粒体处理,并在标准培养条件(37°C)下温育过夜。在标准条件下的过夜培养后,测量肺匀浆裂解物中的IL-6和IFN- γ 。与未处理的对照肺匀浆相比,线粒体处理降低了IL-6和IFN- γ 的分泌。所执行的统计分析是单因素ANOVA(* $P \leq 0.05$,与INF- γ 对照相比;# $P \leq 0.05$,与IL-6对照相比)。

[0077] 发明详述

[0078] 现在将通过下述实施例说明本发明,而不限所述发明的范围。

[0079] I. 定义

[0080] 为了促进本发明的理解,下文定义了许多术语和短语。除非另有说明,否则技术术语根据常规用法使用。

[0081] 如本文所用,当用于修饰数值或数值范围时,术语“约”和“大约”指示高于所述值或范围的5%至10%和低于所述值或范围的5%至10%的偏差保持在所述值或范围的预期含义内。

[0082] “施用(Administering)”(或任何形式的施用(administration),例如“施用(administered)”)意指将有效量的组合物递送至如本文所述的受试者。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如皮下、肌肉、皮内和静脉内)、经口、皮肤和经皮途径。

[0083] 术语“缺氧”、“缺氧的”和“缺氧条件”可以指在其下切断对器官、组织或细胞的氧供应的条件。术语“缺氧”、“缺氧的”和“缺氧条件”也可以指器官、组织或细胞中几乎完全不存在氧,如果延长,则可能导致器官、组织或细胞死亡。

[0084] 如本文所用,术语“检测”是指定量或定性鉴定样品内的核苷酸、核酸或蛋白质。

[0085] 术语“分化”是指未特化(“未定型”)或不太特化的细胞通过其获得特化细胞(例如神经细胞、肌肉细胞或巨噬细胞)特征的任何过程。分化细胞是在细胞谱系内占据更特化(“定型”)位置的细胞。当应用于分化过程时,术语定型的是指在分化途径中已进行到某一点的细胞,在所述点下,在正常情况下,它将继续分化成特定的细胞类型或细胞类型的亚

群,并且在正常情况下,不能分化成不同的细胞类型或恢复到分化程度较低的细胞类型。

[0086] 术语“外源的”和“异源的”在本文中可互换使用,并且包括通常不存在于原核或真核细胞中的核酸、蛋白质或细胞器(例如猪线粒体)。在用于指核酸的一部分时,这些术语指示该核酸包含在自然界中并未发现彼此处于相同关系的两个或更多个子序列。例如,核酸通常是重组产生的,具有来自无关基因的两个或更多个序列,其排列为制备新的功能性核酸(例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区)。类似地,异源蛋白质指示该蛋白质包含在自然界中并未发现彼此处于相同关系的两个或更多个子序列(例如融合蛋白)。

[0087] 术语“离体”是指应用于从生物中获得的细胞、组织或其它样品的条件,所述条件在生物的外部发生。

[0088] 如本文所用,术语“冻融”和“冻融循环”是指将本发明的线粒体冷冻至低于0℃的温度,将线粒体在低于0℃的温度下维持限定的时间段,并将线粒体解冻至室温或体温或高于0℃的任何温度,其允许根据本发明的方法施用线粒体。每种可能性代表本发明的一个分开实施方案。如本文所用,术语“室温”是指18℃至25℃的温度。在另一个实施方案中,经历了冻融循环的线粒体在至少-70℃的温度下冷冻。在另一个实施方案中,已经历冻融循环的线粒体在至少-20℃的温度下冷冻。在另一个实施方案中,已经历冻融循环的线粒体在至少-4℃的温度下冷冻。在另一个实施方案中,已经历冻融循环的线粒体在至少0℃的温度下冷冻。根据另一个实施方案,线粒体的冷冻是逐渐的。根据一些实施方案,线粒体的冷冻是通过速冻。如本文所用,术语“速冻”是指通过使线粒体经受低温来使其快速冷冻。

[0089] 根据另一个实施方案,在包含冷冻保护剂的冷冻缓冲液中冷冻线粒体。根据一些实施方案,冷冻保护剂是脂质、蛋白质、糖类、二糖、寡糖、多糖或其任何组合。在优选的实施方案中,冷冻保护剂是海藻糖、蔗糖、甘油、plasmaLyte、CryoStor、二甲亚砜(DMSO)、谷氨酸盐、白蛋白、聚乙二醇(PEG)、聚(乙烯醇)(PVA)或其任何组合。每种可能性代表本发明的一个分开实施方案。根据另一个实施方案,冷冻缓冲液中的冷冻保护剂浓度是足以作用于保存线粒体功能的冷冻保护剂浓度。不希望受任何理论或机制的束缚,与未经历冻融循环或者已在不含糖类、二糖(例如蔗糖、海藻糖)、寡糖或多糖的冷冻缓冲液或分离缓冲液内冷冻的对照线粒体相比,已在包含糖类、二糖(例如蔗糖、海藻糖)、寡糖或多糖的冷冻缓冲液内冷冻的线粒体在解冻之后证实可比较或更高的耗氧率。

[0090] 根据一些实施方案,术语“功能性线粒体”是指消耗氧的线粒体。根据另一个实施方案,功能性线粒体具有完整的外膜。根据一些实施方案,功能性线粒体是完整的线粒体。在另一个实施方案中,功能性线粒体以随着时间过去增加的速率消耗氧。在另一个实施方案中,线粒体的功能通过耗氧量进行测量。在另一个实施方案中,线粒体的耗氧量可以通过本领域已知的任何方法进行测量,所述方法例如但不限于MitoXpress荧光探针(Luxcel)和Seahorse测定。根据一些实施方案,功能性线粒体是在ADP和底物(例如但不限于谷氨酸盐、苹果酸盐或琥珀酸盐)的存在下,展示耗氧率增加的线粒体。每种可能性代表本发明的一个分开实施方案。在另一个实施方案中,功能性线粒体是产生ATP的线粒体。在另一个实施方案中,功能性线粒体是能够制造其自身RNA和蛋白质并且是自我复制结构的线粒体。在另一个实施方案中,功能性线粒体产生线粒体核糖体和线粒体tRNA分子。

[0091] 术语“基因”是指编码RNA的核酸,例如,包括但不限于编码多肽的结构基因的核酸

序列。

[0092] 术语“缺氧”、“缺氧的”和“缺氧条件”指在其下器官、组织或细胞接受不足的氧供应的条件。

[0093] 如本文所用,术语“完整线粒体”是指包含外膜和内膜、膜间隙、嵴(由内膜形成)和基质的线粒体。在另一个实施方案中,完整线粒体包含线粒体DNA。在另一个实施方案中,完整线粒体含有嵌入内膜的活性呼吸链复合物I-V。在另一个实施方案中,完整线粒体消耗氧。根据另一个实施方案,线粒体膜的完整性可以通过本领域已知的任何方法进行确定。在一个非限制性实例中,使用四甲基若丹明甲酯(TMRM)或四甲基若丹明乙酯(TMRE)荧光探针来测量线粒体膜的完整性。每种可能性代表本发明的一个分开实施方案。在显微镜下观察并显示明亮的TMRM或TMRE染色的线粒体具有完整的线粒体外膜。

[0094] 术语“缺血”定义为特定器官、组织或细胞的血液供应不足。血液供应降低的后果是对器官、组织或细胞的氧供应不足(缺氧)。延长的缺氧可能导致对受影响的器官、组织或细胞的损伤。

[0095] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是处于自然界中并未发现的形式多肽、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已纯化至它们不再处于其在自然界中发现的形式的程度的那些。在一些实施方案中,分离的多肽、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。

[0096] 如本文所用,术语“分离的线粒体”是指与其它细胞组分分开的线粒体,其中线粒体的重量占线粒体和其它亚细胞级分的合并重量的多于80%。分离线粒体的制备可能涉及改变缓冲液组成或另外的洗涤步骤、清洁周期、离心周期和超声周期,其在部分纯化的线粒体的制备中是不需要的。不希望受任何理论或机制的束缚,此类另外的步骤和周期可能损害分离的线粒体的功能性。如本文所用,异种来源的线粒体是指衍生自与来自不同物种的待治疗受试者不同的受试者的线粒体。如本文所用,自体来源的线粒体是指衍生自待治疗的相同受试者的线粒体。如本文所用,同种异体来源的线粒体是指衍生自与来自相同物种的待治疗受试者不同的受试者的线粒体。

[0097] 如本文所用,术语“线粒体膜”是指选自线粒体内膜、线粒体外膜或其组合的线粒体膜。

[0098] 如本文所用,术语“线粒体蛋白质”是指源于线粒体的蛋白质,包括由基因组DNA或mtDNA编码的线粒体蛋白质。如本文所用,术语“细胞蛋白质”是指源于线粒体由其产生的细胞或组织的所有蛋白质。

[0099] 术语“调节(modulate)”或“调节(modulates)”意指编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚基或肽的RNA分子或等价RNA分子的基因表达或水平、或者一种或多种蛋白质亚基或肽的活性这样进行上调或下调,使得表达、水平或活性大于或小于在调节剂的不存在下观察到的那种。术语“调节”包括“抑制”。

[0100] 如本文所用,术语“常氧的”和“常氧”是指正常氧水平的状态。

[0101] 术语“核苷酸序列”和“核酸序列”是指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)序列,包括但不限于信使RNA(mRNA)、DNA/RNA杂交体或合成核酸。核酸可以是单链的,或者部分或完全双链的(双链体)。双链体核酸可以是同源双链体或异源双链体。

[0102] 如本文所用,术语“器官”是指身体的部分或结构,其适合于一种或多种特殊功能。

在特定的实施方案中,器官是肺、肝、肾、心脏、胰腺和肠,包括胃和肠。

[0103] 可以与术语生物相容的载体或赋形剂互换使用的术语“药学上可接受的载体或赋形剂”,是指这样的试剂、细胞、化合物、材料、组合物和/或剂型,其不仅与待在治疗上施用的细胞和其它试剂相容,而且在合理的医学判断范围内,适用于与人类和动物的组织接触,而无过度毒性、刺激性、变应性应答、或与合理的利益/风险比相称的其它并发症。适用于本发明的药学上可接受的载体或赋形剂包括液体、半固体(例如凝胶)和固体材料(例如细胞支架和基质、管板和本领域已知的且在本文中更详细地描述的其它此类材料)。这些半固体和固体材料可能被设计为抵抗体内降解(生物不可降解的),或者它们可能被设计为在体内降解(生物可降解的、生物可侵蚀的)。生物可降解的材料可以进一步是生物可再吸收的或生物可吸收的,即它可以溶解并吸收到体液内(水溶性植入物是一个实例),或者通过转换成其它材料或通过天然途径分解和消除而降解并最终从体内消除。

[0104] 如本文所用,术语“多核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的聚合物。多核苷酸由四种碱基构成:腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶/尿嘧啶(尿嘧啶用于RNA)。来自核酸的编码序列指示由核酸编码的蛋白质的序列。该术语包括本领域已知的各种修饰和类似物。

[0105] 术语“蛋白质”、“肽”、“多肽”和“氨基酸序列”在本文中可互换使用,以指任何长度的氨基酸残基的聚合物。所述聚合物可以是线性的或支化的。所述聚合物可以包含修饰的氨基酸或氨基酸类似物,并可以被除氨基酸外的化学部分中断。这些术语还包括已天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或者任何其它操作或修饰,例如与标记或生物活性组分缀合。

[0106] 关于核酸或多肽的术语“重组”是指具有并非天然存在的序列,或者具有通过人工组合两个或更多个另外分离的序列区段而制备的序列的核酸或多肽。这种人工组合通常通过化学合成来实现,或者更常见地,通过人工操作分离的核酸区段,例如通过遗传改造技术来实现。重组多肽也可以指已使用重组核酸制备的多肽,包括转移到并非多肽的天然来源的宿主生物的重组核酸。在用于指细胞、病毒或载体时,术语“重组”指示细胞、病毒或载体已通过实验室方法进行修饰或者是实验室方法的结果。重组细胞、病毒或载体可以包括已通过引入异源核酸或蛋白质或者改变天然核酸或蛋白质进行修饰的细胞、病毒或载体。因此,例如,重组细胞包括表达在细胞的天然(非重组)形式内并未发现的基因,或者表达以其它方式异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因的细胞。

[0107] 术语“再灌注”是指在缺血时期之后组织或器官中的血流恢复。

[0108] 术语“样品”以其最广泛的含义使用。怀疑含有核酸的样品可以包含细胞、从细胞分离的染色体(例如中期染色体的扩散)、基因组DNA、RNA、cDNA等等。

[0109] 如本文所用,术语“干细胞”和“祖细胞”是指能够自我复制和具有多能性的细胞。通常,干细胞和祖细胞可以使受伤的组织再生。本文的干细胞和祖细胞可以是但不限于胚胎干(ES)细胞或组织干细胞(也称为组织特异性干细胞或成体干细胞)。可以具有上述能力的任何人工产生的细胞(例如本文使用的融合细胞、重新编程细胞等等)可以是干细胞或祖细胞。ES细胞是衍生自早期胚胎的多能干细胞。

[0110] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物,例如非人灵长类动物、绵羊、犬、猫、兔、雪貂、啮齿类动物(例如小鼠、大鼠和豚

鼠)、禽类物种(例如鸡)、两栖动物和爬行动物。在优选的实施方案中,受试者是哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、犬、猫、兔、雪貂或啮齿类动物。在更优选的实施方案中,受试者是人。术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文中可互换使用。

[0111] 术语“转染”或“转导”可以互换使用,并且定义为将核酸分子或蛋白质引入细胞内的过程。使用非病毒方法或基于病毒的方法将核酸引入细胞内。核酸分子可以是编码完整蛋白质或其功能部分的序列。通常,核酸载体包含对于蛋白质表达所必需的元件(例如启动子、转录起始位点等)。非病毒转染方法包括并不使用病毒DNA或病毒颗粒作为递送系统以将核酸分子引入细胞内的任何适当方法。示例性的非病毒转染方法包括磷酸钙转染、脂质体转染、核转染、声致穿孔、通过热休克的转染、磁转染(magnetofection)和电穿孔。对于基于病毒的方法,任何有用的病毒载体均可以用于本文所述的方法中。病毒载体的实例包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、慢病毒和腺相关病毒载体。在一些方面,遵循本领域已知的标准程序,使用腺病毒载体将核酸分子引入细胞内。术语“转染”或“转导”也指将蛋白质从外部环境引入细胞内。通常,蛋白质的转导或转染依赖于能够穿过细胞膜的肽或蛋白质与目的蛋白质的附着。参见例如,Ford,K.G.等人,Gene Ther.,2001年1月;8(1):1-4和 Prochiantz,A.,Nat Methods,2007年2月;4(2):119-20。

[0112] 如本文所用,术语如“治疗”(treat)/“处理”(treat)是指改善疾病、病理状况或病症的体征或症状的干预或治疗措施。如本文所用,关于疾病、病症、病理状况或症状的术语“治疗”/“处理”也指治疗的任何可观察到的有益效应。有益效应可以例如通过以下得到证明:疾病、状况或病症的症状的延迟发作;疾病、状况或病症的较慢进展;疾病、状况或病症的复发次数减少;受试者的整体健康或福祉的改善;或者本领域已知的对于特定疾病、状况或病症特异性的其它参数。预防性治疗是施用于并未显示出疾病、状况或病症的体征或者仅显示出早期体征的受试者的治疗,目的是降低发展病理状态的风险。治疗性治疗是在疾病、状况或病症的体征和症状已发展后,施用于受试者的治疗。

[0113] 术语“载体”意指能够在宿主细胞中递送且表达一种或多种目的基因或序列的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸露的DNA或RNA表达载体、质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体、封装在脂质体中的DNA或RNA表达载体、以及某些真核细胞如生产细胞。

[0114] 如本公开和权利要求中所用,单数形式“一”和“该/所述”包括复数形式,除非上下文另有明确规定。

[0115] 如关于实施方案所用的术语“包含”、“包括”、“具有”等等是同义词。应理解,在本文中用语言“包含”描述的实施方案的任何地方,还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的在其它方面类似的实施方案。

[0116] 为了本说明书的目的,以“A/B”形式或“A和/或B”形式的短语意指(A)、(B)或(A和B)。为了本说明书的目的,以形式“A、B和C中的至少一个”的短语意指(A)、(B)、(C)、(A和B)、(A和C)、(B和C)或(A、B和C)。

[0117] 本说明书可以使用术语“实施方案”,其可以各自指一个或多个相同或不同的实施方案。

[0118] II. 器官移植方法

[0119] 本文公开了器官移植方法,该方法包括将分离的线粒体递送至预期用于移植的器

官。在一些实施方案中,器官来自人供体、同种异体的、异体的、来自非人供体(例如猪)、或者完全或部分改造的(例如来自对于移植再细胞化的猪肾的脱细胞基质)。在一些实施方案中,该方法进一步包括从供体中收获器官。在一些实施方案中,该方法进一步包括将用分离的线粒体处理的器官移植到受体内。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受体同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受体自体的分离的线粒体。在优选的实施方案中,预期用于移植的器官从人供体中收获。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于人供体同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于人供体自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,预期用于移植的器官由猪器官支架进行改造。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。

[0120] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官的细胞相比,用分离的线粒体处理的器官的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在一些实施方案中,在从供体中收获器官的步骤之前,将分离的线粒体递送至器官。在其它实施方案中,在从供体中收获器官的步骤之后,将分离的线粒体递送至器官。在优选的实施方案中,器官是人器官。在其它实施方案中,器官是用于异种移植到受体内的猪器官。

[0121] 在优选的实施方案中,器官是肺。在特别优选的实施方案中,将用分离的线粒体处理的肺移植到患有肺高血压的人受体内。在特别优选的实施方案中,肺是人肺。在一些实施方案中,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至肺。

[0122] 在优选的实施方案中,器官是肾。在特别优选的实施方案中,将用分离的线粒体处理的肾移植到患有肾疾病或病症的人受体内。在特别优选的实施方案中,肾是人肾。在一些实施方案中,将分离的线粒体静脉内或动脉内递送至肾。

[0123] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官、肾或肺相比,用分离的线粒体处理的器官、肾或肺具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0124] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官、肾或肺相比,用分离的线粒体处理的器官、肾或肺具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改

变的血红素加氧酶-1 (HO-1) 表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与Bax、Bid、Bad或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与Bcl-2和/或Mcl-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0125] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官、肾或肺相比,用分离的线粒体处理的器官、肾或肺具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、GLUT、VDAC1、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0126] 本文还公开了改善受试者中所植入的组织或所移植的器官的性能的方法,该方法包括在组织或器官的植入或移植之前、期间或之后,将分离的线粒体递送至组织或器官,其中所述组织或器官是供体组织、供体器官、改造的组织或改造的器官。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于组织或器官同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于组织或器官自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,组织或器官是人组织或器官。在其它实施方案中,组织或器官是用于异种移植到受试者内的猪组织或器官。在优选的实施方案中,器官是肾。在优选的实施方案中,器官是肺。在特别优选的实施方案中,肺是人肺。在一些实施方案中,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至肺。在优选的实施方案中,组织或器官选自:血管、输尿管、气管和皮片(skin patch)。在优选的实施方案中,器官是肾。在特别优选的实施方案中,肾是人肾。在一些实施方案中,将分离的线粒体静脉内或动脉内递送至肾。

[0127] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官或组织的细胞相比,用分离的线粒体处理的组织或器官的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。

[0128] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应组织或器官相比,用分离的线粒体处理的组织或器官具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性

ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1 及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0129] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应组织或器官相比,用分离的线粒体处理的组织或器官具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂 (BIM、PUMA)、促凋亡效应物 (BAX、BAK)、促凋亡因子 (SMAC、DIABLO、BID、BAD等) 或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0130] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应组织或器官相比,用分离的线粒体处理的组织或器官具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0131] 在一些实施方案中,组织或器官通过生物打印生成。参见例如,Murphy, S. V. 和 Atala, A., Nat Biotechnol, 2004, 32 (8) : 773-85。

[0132] 改善的线粒体功能的非限制性实例是至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的耗氧量增加和/或三磷酸腺苷 (ATP) 合成增加。

[0133] 将分离的线粒体递送至器官或组织的途径的非限制性实例是通过肺气道的递送、静脉内递送和动脉内递送。

[0134] III. 改善器官、组织或肺功能的方法

[0135] 本文公开了改善经受离体肺灌注 (EVLV) 的肺的功能的方法,该方法包括:(i) 将分

离的线粒体递送至肺,并且(ii)通过用来自贮库的灌注液对肺进行灌注,在腔室或容器中对肺执行EVLP。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于肺同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于肺自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺的细胞相比,用分离的线粒体处理的肺的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的一个或多个EVLP参数改善。在优选的实施方案中,肺是人肺。

[0136] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的活性氧(ROS)诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。在一些实施方案中,间隙连接标记物包含连接粘附分子1(JAM1)和CD31。在一些实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和干扰素- γ (IFN- γ)。在一些实施方案中,ROS介导的氧化副产物包含4-羟基壬烯醛(4-HNE)和8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)。在一些实施方案中,ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

[0137] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在执行EVLP之前,从供体中收获肺的步骤。在其它实施方案中,该方法进一步包括在执行EVLP之前从供体中收获肺、以及在执行EVLP之后将肺移植到受体内的步骤。

[0138] 在一些实施方案中,受体是患有肺疾病或病症的人受体。在一些实施方案中,肺疾病或病症是肺高血压、支气管肺发育不良(BPD)、肺纤维化、哮喘、睡眠呼吸障碍或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。肺高血压(pulmonary hypertension)的非限制性实例包括由于COPD的肺高血压、慢性血栓栓塞性肺高血压(CTEPH)、肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension)(PAH)、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)、肺毛细血管瘤病(PCH)、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

[0139] 在一些实施方案中,在执行EVLP之前,将分离的线粒体递送至肺。在其它实施方案中,在执行EVLP的同时,将分离的线粒体递送至肺。在一些实施方案中,在执行EVLP之后,将分离的线粒体递送至肺。在一些实施方案中,在从供体中收获肺的步骤之前,将分离的线粒体递送至肺。在其它实施方案中,在从供体中收获肺的步骤之后,将分离的线粒体递送至肺。在一些实施方案中,在从供体中收获肺的步骤之前,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至肺。在其它实施方案中,在从供体中收获肺的步骤之后,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至肺。

[0140] 在优选的实施方案中,将灌注液通过插管的肺动脉引入肺内。在优选的实施方案中,肺通过插管的气管在腔室或容器中进行通气。

[0141] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋

亡或其任何组合。在一些实施方案中,间隙连接标记物包含JAM1和CD31。在一些实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。在一些实施方案中,ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。在一些实施方案中,ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

[0142] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0143] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的HO-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0144] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0145] 稳定、维持或改善的EVLVP参数的非限制性实例是：稳定或改善的肺动脉压 (PAP)；改善或维持的潮气量 (TV)；改善或维持的动态顺应性 (TV/ (吸气峰压 (PIP) - 呼气末正压 (PEEP)))；增加的葡萄糖/乳糖比；降低的细胞死亡的组织学测量 (例如，如通过TUNEL测定测量的降低的细胞死亡)；增加的血管生成和间隙连接形成；稳定或改善 (即降低) 的肺血管阻力 (PVR)；减少的乳酸盐产生；减少的铵产生；改善的每分钟通气量；改善的血流量；减少的肺水肿；改善的肺弹性；以及稳定或改善的气体交换。增加的CD31表达指示了血管生成和间隙连接形成。

[0146] 灌注液的非限制性实例是Steen溶液、Perfadex、低钾右旋糖酐溶液、全血、稀释血液、浓缩红细胞 (RBC)、血浆替代品、一种或多种血管扩张剂、碳酸氢钠、葡萄糖和其任何组合。

[0147] 将分离的线粒体递送至肺的非限制性实例是通过气道的递送、从腔室或容器的贮库递送、静脉内递送和动脉内递送。

[0148] 本文还公开了在运输、运送或储存期间用于使由于冷缺血对离体器官的损害降到最低的方法，该方法包括：在冷缺血前0-24小时、在冷缺血期间或在冷缺血后0-24小时，将分离的线粒体递送至器官，其中与未用分离的线粒体处理的相应器官的细胞相比，用分离的线粒体处理的器官的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善，并且其中所述改善的线粒体功能是至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的耗氧量增加和/或ATP合成增加。在一些实施方案中，分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中，分离的线粒体是对于器官同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中，分离的线粒体是对于器官自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中，该方法进一步包括从供体中收获器官的步骤。在一些实施方案中，在冷缺血前0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时，将分离的线粒体递送至器官。在其它实施方案中，在冷缺血期间，将分离的线粒体递送至器官。在其它实施方案中，在冷缺血后0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时，将分离的线粒体递送至器官。在优选的实施方案中，器官是人器官。在其它实施方案中，器官是用于异种移植到人受试者内的猪器官。

[0149] 在优选的实施方案中，与未用分离的线粒体处理的相应器官相比，用分离的线粒体处理的器官具有减少的ROS介导的氧化副产物产生、改善的细胞活力、减少的坏死、减少的细胞裂解、增加的细胞ATP的总水平、减少的炎性细胞因子分泌或其任何组合。在一些实施方案中，炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。在一些实施方案中，ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

[0150] 在优选的实施方案中，用分离的线粒体处理的器官是肾。在其它优选的实施方案中，器官是肾，并且该方法进一步包括将用分离的线粒体处理的肾移植到患有肾疾病或病症的人受体内的步骤。在其它优选的实施方案中，器官是肾，并且该方法进一步包括从供体中收获肾的步骤。在其它优选的实施方案中，器官是肾，并且该方法进一步包括从供体中收获肾，并且将用分离的线粒体处理的肾移植到患有肾疾病或病症的人受体内的步骤。

[0151] 在优选的实施方案中，器官是肺，并且该方法进一步包括通过用来自贮库的灌注液对肺进行灌注，在腔室或容器中对肺执行EVLVP的步骤。在其它优选的实施方案中，器官是

肺,并且该方法包括以下步骤:从供体中收获肺,并且通过用来自贮库的灌注液对肺进行灌注,在腔室或容器中对肺执行EVLP。在其它优选的实施方案中,器官是肺,并且该方法包括以下步骤:从供体中收获肺,通过用来自贮库的灌注液对肺进行灌注,在腔室或容器中对肺执行EVLP,并且将肺移植到患有肺高血压的人受体内。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有增强的一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的肺具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的一个或多个EVLP参数的改善。在特别优选的实施方案中,肺是人肺。

[0152] 在一些实施方案中,在执行EVLP之前,将分离的线粒体递送至肺。在其它实施方案中,在执行EVLP的同时,将分离的线粒体递送至肺。在其它实施方案中,在执行EVLP之后,将分离的线粒体递送至肺。在一些实施方案中,在从供体中收获肺的步骤之前,将分离的线粒体递送至肺。在其它实施方案中,在从供体中收获肺的步骤之后,将分离的线粒体递送至肺。

[0153] 在优选的实施方案中,将灌注液通过插管的肺动脉引入肺内。在优选的实施方案中,肺通过插管的气管在腔室或容器中进行通气。

[0154] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官、肾或肺相比,用分离的线粒体处理的器官、肾或肺具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0155] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官、肾或肺相比,用分离的线粒体处理的器官、肾或肺具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少

2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0156] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应器官、肾或肺相比,用分离的线粒体处理的器官、肾或肺具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0157] 本文还公开了用于改善改造的器官或组织的功能的方法,该方法包括:(i)制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架,(ii)用填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的器官或组织支架,以产生改造的器官或组织,并且(iii)将分离的线粒体递送至改造的器官或组织。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的器官或组织同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的器官或组织自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官的细胞相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织是改造的人器官或组织。

[0158] 在一些实施方案中,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织是改造的人肾。在一些实施方案中,用分离的线粒体处理的改造的人器官或组织是改造的人肺。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有PAP;TV;动态顺应性;PVR;气体交换;或其任何组合的稳定性或维持性增强。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的一个或多个EVLP参数的改善。在特别优选的实施方案中,一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP;改善的TV;改善的动态顺应性;增加的葡萄糖/乳糖比;降低的细胞死亡的组织学测量;增加的血管生成和间隙连接形成;降低的PVR;减少的乳酸盐产生;减少的铵产生;改善的每

分钟通气量;改善的血流量;减少的肺水肿;改善的肺弹性;改善的气体交换;或其任何组合。

[0159] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。在一些实施方案中,间隙连接标记物包含JAM1和CD31。在一些实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。在一些实施方案中,ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。在一些实施方案中,ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

[0160] 在一些实施方案中,在填充器官或组织支架的步骤之后,将分离的线粒体递送至改造的器官或组织。在其它实施方案中,在填充器官或组织支架的步骤期间,将分离的线粒体递送至改造的器官或组织。在优选的实施方案中,在填充器官或组织支架的步骤期间,将分离的线粒体连同生物反应器、腔室或容器中的填充细胞一起递送至改造的器官或组织。

[0161] 在一些实施方案中,在生物反应器、腔室或容器中填充器官或组织支架之前,将分离的线粒体注入器官或组织支架。

[0162] 在一些实施方案中,器官或组织支架通过生物打印生成。在优选的实施方案中,填充细胞和人工器官或组织基质同时进行生物打印,以产生改造的器官或组织。参见例如, Murphy, S.V. 和 Atala, A., Nat Biotechnol, 2004, 32 (8) :773-85。

[0163] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0164] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细

胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0165] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0166] 填充细胞的非限制性实例是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、免疫细胞、间充质细胞、周细胞及其任何组合。

[0167] 将分离的线粒体递送至改造的器官和组织的非限制性实例是静脉内递送、动脉内递送、气管内递送、或通过灌注的递送、或者经由淋巴系统或支气管循环的递送。

[0168] 本文还公开了用于改善改造的器官或组织的功能的方法,该方法包括:(i)制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架,并且(ii)用由分离的线粒体处理的填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的器官或组织支架,以产生改造的器官或组织。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的器官或组织同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的器官或组织自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官的细胞相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织是改造的人器官或组织。

[0169] 在一些实施方案中,用分离的线粒体处理的改造的人器官或组织是改造的人肺。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处

理的改造的人肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有PAP;TV;动态顺应性;PVR;气体交换;或其任何组合的稳定性或维持性增强。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的一个或多个EVLP参数的改善。在特别优选的实施方案中,一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP;改善的TV;改善的动态顺应性;增加的葡萄糖/乳糖比;降低的细胞死亡的组织学测量;增加的血管生成和间隙连接形成;降低的PVR;减少的乳酸盐产生;减少的铵产生;改善的每分钟通气量;改善的血流量;减少的肺水肿;改善的肺弹性;改善的气体交换;或其任何组合。

[0170] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。在一些实施方案中,间隙连接标记物包含JAM1和CD31。在一些实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。在一些实施方案中,ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。在一些实施方案中,ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

[0171] 在一些实施方案中,在生物反应器、腔室或容器中填充器官或组织支架之前,将分离的线粒体注入器官或组织支架。

[0172] 在一些实施方案中,器官或组织支架通过生物打印生成。在优选的实施方案中,填充细胞和人工器官或组织基质同时进行生物打印,以产生改造的器官或组织。参见例如, Murphy, S.V. 和 Atala, A., *Nat Biotechnol*, 2004, 32 (8) : 773-85。

[0173] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0174] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线

粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的HO-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0175] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,用分离的线粒体处理的改造的器官或组织具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0176] 本文还公开了用于改善改造的器官或组织的功能的方法,该方法包括:(i)制备包含一种或多种细胞外基质组分的器官或组织支架,(ii)将分离的线粒体注入器官或组织支架,并且(iii)用填充细胞填充在生物反应器、腔室或容器中的注入的器官或组织支架,以产生改造的器官或组织。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的器官或组织同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的器官或组织自体的分离的线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺的细胞相比,改造的肺的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,改造的器官或组织具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中,改造的器官或组织是改造的人器官或组织。

[0177] 在一些实施方案中,改造的器官或组织是改造的人肾。在一些实施方案中,改造的人器官或组织是改造的人肺。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,改造的人具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,改造的人肺具有PAP;TV;动态顺应性;PVR;气体交换;或其任何组合的稳定性或维持性增强。在优选的实施方案中,与未用

分离的线粒体处理的相应肺相比,改造的人肺具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的一个或多个EVLP参数的改善。在特别优选的实施方案中,一个或多个EVLP参数的改善是改善的PAP;改善的TV;改善的动态顺应性;增加的葡萄糖/乳糖比;降低的细胞死亡的组织学测量;增加的血管生成和间隙连接形成;降低的PVR;减少的乳酸盐产生;减少的铵产生;改善的每分钟通气量;改善的血流量;减少的肺水肿;改善的肺弹性;改善的气体交换;或其任何组合。

[0178] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应人改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有改善的间隙连接标记物表达、减少的ROS诱导的DNA氧化、减少的ROS介导的氧化副产物产生、减少的ROS介导的趋化因子分泌、减少的炎性细胞因子水平、减少的细胞凋亡或其任何组合。在一些实施方案中,间隙连接标记物包含JAM1和CD31。在一些实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。在一些实施方案中,ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。在一些实施方案中,ROS介导的趋化因子包含IL-8、CXCL9、MCP-1和GRO α 。

[0179] 在一些实施方案中,器官或组织支架通过生物打印生成。在优选的实施方案中,填充细胞和人工器官或组织基质同时进行生物打印,以产生改造的器官或组织。参见例如, Murphy, S.V. 和 Atala, A., Nat Biotechnol, 2004, 32 (8) : 773-85。

[0180] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,改造的器官或组织具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0181] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,改造的器官或组织具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优

选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0182] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的器官或组织相比,改造的器官或组织具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0183] 本文还公开了用于改善改造的肺的功能的方法,该方法包括:(i)用重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肺,以产生改造的肺,并且(ii)将分离的线粒体递送至改造的肺。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肺同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肺自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺的细胞相比,用分离的线粒体处理的改造的肺的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中,改造的肺是改造的人肺。

[0184] 在一些实施方案中,在重新填充脱细胞支架肺的步骤之后,将分离的线粒体递送至改造的肺。在其它实施方案中,在重新填充脱细胞支架肺的步骤期间,将分离的线粒体递送至改造的肺。在优选的实施方案中,在重新填充脱细胞支架肺的步骤期间,将分离的线粒体连同生物反应器、腔室或容器中的重新填充细胞一起递送至改造的肺。在特别优选的实施方案中,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至改造的肺。

[0185] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括通过用来自贮库的灌注液对改造的肺进行灌注,对改造的肺执行EVLP的步骤。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有一个或多个EVLP参数的稳定性或维持性增强。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的人肺相比,用分离的线粒体处理的改造的人肺具有PAP;TV;动态顺应性;PVR;气体交换;或其任何组合的稳定性或维持性增强。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的一个或多个EVLP参数的改善。在特别优选的实施方案中,一个或多

个EVL P参数的改善是改善的PAP;改善的TV;改善的动态顺应性;增加的葡萄糖/乳糖比;降低的细胞死亡的组织学测量;增加的血管生成和间隙连接形成;降低的PVR;减少的乳酸盐产生;减少的铵产生;改善的每分钟通气量;改善的血流量;减少的肺水肿;改善的肺弹性;改善的气体交换;或其任何组合。在一些实施方案中,在执行EVL P之前,将分离的线粒体递送至改造的肺。在其它实施方案中,在执行EVL P的同时,将分离的线粒体递送至改造的肺。在一些实施方案中,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至改造的肺。在其它实施方案中,将分离的线粒体从贮库递送至改造的肺。

[0186] 在一些实施方案中,将灌注液通过插管的肺动脉引入改造的肺内。灌注液的非限制性实例是Steen溶液、Perfadex、低钾右旋糖酐溶液、全血、稀释血液、浓缩RBC、血浆替代品、一种或多种血管扩张剂、碳酸氢钠、葡萄糖及其任何组合。在一些实施方案中,改造的肺通过插管的气管在腔室或容器中进行通气。

[0187] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0188] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的HO-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂 (BIM、PUMA)、促凋亡效应物 (BAX、BAK)、促凋亡因子 (SMAC、DIABLO、BID、BAD等) 或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡

与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0189] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0190] 重新填充细胞的非限制性实例是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、免疫细胞、间充质细胞、周细胞及其任何组合。

[0191] 本文还公开了用于改善改造的肺的功能的方法,该方法包括:(i)将分离的线粒体递送至重新填充细胞,并且(ii)用由分离的线粒体处理的重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肺,以产生改造的肺。同样地,该方法可以包括使用细胞重新填充脱细胞支架肺,在细胞已递送至脱细胞支架之前、期间、之后或其组合,所述细胞已用分离的线粒体进行处理。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肺同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肺自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺的细胞相比,用分离的线粒体处理的改造的肺的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中,改造的肺是改造的人肺。

[0192] 在一些实施方案中,该方法进一步包括通过用来自贮库的灌注液对改造的肺进行灌注,对改造的肺执行EVLP的步骤。在一些实施方案中,将灌注液通过插管的肺动脉引入改造的肺内。在一些实施方案中,改造的肺通过插管的气管在腔室或容器中进行通气。

[0193] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES(CCL5)、可溶性ICAM-1(sICAM-1)、M-CSF(CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8(CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相

关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0194] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的HO-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0195] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肺相比,用分离的线粒体处理的改造的肺具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0196] 本文还公开了用于改善改造的肾的功能的方法,该方法包括:(i)用重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肾,以产生改造的肾,并且(ii)将分离的线粒体递送至改造的肾。同样地,该方法可以包括使用细胞重新填充脱细胞支架肾,在细胞已递送至脱细胞支架之前、期间、之后或其组合,所述细胞已用分离的线粒体进行处理。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肾同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肾自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾的细胞相比,用分离的线粒体处理的改造的肾的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比,用分离的线粒体处理的改造的肾具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、

增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中，改造的肾是改造的人肾。

[0197] 在一些实施方案中，在重新填充脱细胞支架肾的步骤之后，将分离的线粒体递送至改造的肾。在其它实施方案中，在重新填充脱细胞支架肾的步骤期间，将分离的线粒体递送至改造的肾。在优选的实施方案中，在重新填充脱细胞支架肾的步骤期间，将分离的线粒体连同生物反应器、腔室或容器中的重新填充细胞一起递送至改造的肾。在特别优选的实施方案中，将分离的线粒体静脉内或动脉内递送至改造的肾。

[0198] 在一些实施方案中，与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比，用分离的线粒体处理的改造的肾具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中，减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中，减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中，减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中，减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L) 及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中，减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0199] 在一些实施方案中，与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比，用分离的线粒体处理的改造的肾具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中，减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的HO-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中，改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中，减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中，减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中，减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂 (BIM、PUMA)、促凋亡效应物 (BAX、BAK)、促凋亡因子 (SMAC、DIABLO、BID、BAD等) 或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中，减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中，减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少

20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0200] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比,用分离的线粒体处理的改造的肾具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0201] 重新填充细胞的非限制性实例是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、免疫细胞、间充质细胞、周细胞及其任何组合。

[0202] 本文还公开了用于改善改造的肾的功能的方法,该方法包括:(i)将分离的线粒体递送至重新填充细胞,并且(ii)用由分离的线粒体处理的重新填充细胞重新填充在生物反应器、腔室或容器中的脱细胞支架肾,以产生改造的肾。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肾同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于改造的肾自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾的细胞相比,用分离的线粒体处理的改造的肾的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在特别优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比,用分离的线粒体处理的改造的肾具有一种或多种改善的细胞、器官或组织功能,其中所述一种或多种改善的细胞、器官或组织功能是增加的对支架的细胞粘附、增加的细胞活力、减少的细胞凋亡、减少的细胞损害、增加的细胞增殖、增加的细胞屏障功能、减少的DNA损害、增加的血管生成、改善的血管维持、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生或其任何组合。在优选的实施方案中,改造的肾是改造的人肾。

[0203] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比,用分离的线粒体处理的改造的肾具有减少的炎症和/或免疫细胞活化。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与MAPK14、JNK或p53的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与NF- κ B的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1及其任何组合的分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与活化标记物例如CD69、CD95、CD30、CD137、CD25 (IL2RA)、CD38、CD154 (CD40L)及其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的炎症和/或免疫细胞活化与IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13、IL17、TNF- α 、IFN- γ 或其任何组合的表达或分泌减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0204] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比,用分离的线粒体处理的改造的肾具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导

和/或减少的细胞损害。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的HO-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在一些实施方案中,改变的HO-1表达是在冷暴露后增加的HO-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1或MCL-1的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0205] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应改造的肾相比,用分离的线粒体处理的改造的肾具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0206] 在本方法的一些实施方案中,改造的器官、组织、肾或肺使用人工器官或组织基质生成。用于制备人工器官或组织基质的方法和材料是本领域已知的。可以使用任何适当的材料来制备此类基质。在优选的实施方案中,人工器官或组织基质可以是由多孔材料开发的支架,所述多孔材料例如聚乙醇酸、Pluronic F-127 (PF-127)、明胶海绵、胶原-糖胺聚糖(GAG)、纤维蛋白原-纤连蛋白-玻连蛋白水凝胶(FFVH)和弹性蛋白。参见例如,Ingenito等人,J Tissue Eng Regen Med.2009年12月17日;Hoganson等人,Pediatric Research,2008,63(5):520-526;Chen等人,Tissue Eng.2005年9-10月;11(9-10):1436-48。在一些情况下,人工器官或组织基质可以具有类似于肺泡单位的多孔结构。参见Andrade等人,Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2007,292(2):L510-8。在一些情况下,植入的人工器官或组织基质可以表达器官特异性标记物(例如,关于Clara细胞(即棒状细胞)、肺细胞和呼吸上皮的肺特异性标记物)。在一些情况下,植入的人工器官或组织基质可以组构成可鉴定的结构(例如类似于人工肺基质中的肺泡和末端支气管的结构)。例如,使用FFVH制备的植入式人工肺基质可以促进体外的细胞附着、扩散和细胞外基质表达以及体内的表观植入,具有对周围组织的营养作用的证据。参见Ingenito等人,同上。还参见美国专利号7,662,409和6,087,552;美国专利公开号2010/0034791;2009/0075282;2009/0035855;2008/0292677;2008/0131473;2007/0059293;2005/0196423;2003/0166274;2003/0129751;2002/0182261;2002/0182241;和2002/0172705。在优选的实施方案中,在填充细胞接种之前,将分离的线粒体注入人工器官或组织基质,以支持填充细胞的代谢、附着和活力。

[0207] 在一些实施方案中,人工器官或组织基质通过生物打印生成。参见例如,Murphy, S.V.和Atala,A.,Nat Biotechnol.2004,32(8):773-85。在优选的实施方案中,填充细胞和

人工器官或组织基质同时进行打印,以形成填充的器官或组织基质。在优选的实施方案中,分离的线粒体在打印期间与填充细胞和/或基质一起递送,以便在生物打印的初始阶段过程中支持细胞活力。在优选的实施方案中,在填充细胞接种之前,将分离的线粒体注入生物打印的器官或组织基质,以支持填充细胞的代谢、附着和活力。

[0208] 在本方法的一些实施方案中,准备且维持尸体器官以用于移植。从人和动物供体中分离供体器官(例如肺和肾)的方法和材料是本领域已知的。例如,在Pasque, M.等人, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010, 139(1):13-7和Bribrisco A.等人, *Front Biosci* 2013, 5:266-72中进行描述。可以使用任何适当的方法来分离这些器官。这些供体器官可以使用生物反应器、腔室或容器维持足以准备用于移植的受体的时间、足以将器官运输至受体的时间、或足以将器官维持在促进整个器官或其一部分的修复使得其适合于植入的条件下的时间。

[0209] 在一些实施方案中,来自器官供体的供体器官可以进行修饰,以去除内皮衬里并且随后用受体衍生的内皮细胞重新接种,以使免疫原性降到最低。例如,这可以经由用去离子水灌注、用低浓度洗涤剂(如0.05%聚多卡醇)灌注、或用酶溶液(如DNA酶或胶原酶)灌注,通过渗透性攻击(osmotic challenge)来实现。由于感染、物理损害如外伤、或由于灌注不足延长的缺血性损害、或由于供体状况(如脑死亡)的损害而发现不适合于立即移植的供体器官,可以使用本文所述的装置和方法进行修复(例如通过使用抗生素、细胞、生长因子刺激和抗炎治疗进行固定、灌注和修复)。通过遗传和细胞修饰,可以致使动物衍生的器官的免疫原性降低。

[0210] 在一些情况下,供体肺可能显示出起因于各种因素(例如供体肺的质量、保存溶液的类型、收获和培养之间的时间长度等)的损害证据。为了减少和/或消除损害程度,可以将供体肺和/或其一部分固定在例如本文所述的装置上,并且进行液体通气和/或干燥通气。在一个实例中,空气通过气管线进行灌注,而心室和/或动脉线用模拟生理参数的溶液进行灌注,所述溶液例如生理盐水溶液、含血溶液、Steen溶液、Perfadex和/或保存溶液。供体肺可以保持固定,直到需要供体肺用于移植和/或直到受损的供体肺显示出再上皮化,并且显示出改善的肺功能(例如改善的内皮屏障功能、改善的血管流速、降低的肺水肿和/或改善的动脉血氧分压/吸入氧分数比(PaO_2/FiO_2))。这些灌注方法可以与细胞接种方法相组合,如下所述。

[0211] 在本文所述的一些方法中,肺或肾组织基质(例如脱细胞肺或肾组织基质或者人工肺或肾基质)用细胞(例如分化或再生细胞)进行接种。任何适当的再生细胞类型(例如幼稚或未分化的细胞类型)都可以用于接种肺或肾组织基质。细胞可以在各个阶段进行接种,所述阶段包括但不限于干细胞阶段(例如在诱导后)、祖细胞阶段、成血管细胞阶段或分化阶段(例如CD 31+、CD144+)。如本文所用,再生细胞可以包括但不限于祖细胞、前体细胞和“成人”衍生的干细胞,包括脐带细胞(例如人脐静脉内皮细胞)和胎儿干细胞。再生细胞还可以包括分化的或定型的细胞类型。对于本文提供的方法和材料适当的干细胞可以包括人诱导多能干细胞(iPSC)(例如未分化的、分化的内胚层、前化内胚层(antieriolized endoderm)、TTF-1阳性肺祖细胞)、人间充质干细胞、人脐静脉内皮细胞、多潜能成人祖细胞(MAPC)、iPS衍生的间充质细胞或胚胎干细胞。在一些情况下,也可以使用衍生自其它组织的再生细胞。例如,衍生自皮肤、骨骼、肌肉、心脏、骨髓、滑膜、华顿氏胶、胎盘、包皮或脂肪

组织的再生细胞可以用于开发干细胞接种的组织基质。

[0212] 在一些情况下,本文提供的肺或肾组织基质可以可替代地或进一步用分化的细胞类型,例如(优选人)上皮细胞和内皮细胞进行接种。例如,肺基质可以经由脉管系统(例如通过动脉线或静脉线)用内皮细胞进行接种,并经由气道(例如通过气管线)用上皮细胞进行接种。肺或肾基质也可以用以下进行接种:一种或多种细胞类型(例如一种或多种类型的上皮细胞和间充质细胞、成人外周血衍生的上皮细胞、脐带血衍生的上皮细胞、iPS衍生的上皮细胞、祖细胞阶段细胞(例如平滑肌)、成人肺衍生的细胞混合物(例如大鼠人)、商购可得的小气道上皮细胞或肺泡上皮细胞、胚胎干(ES)细胞衍生的上皮细胞和/或人脐静脉内皮细胞(HUVEC)。任何类型的适当的商购可得的培养基和/或培养基试剂盒均可以用于细胞的接种和培养。例如,SAGM培养基可以用于小气道细胞(例如通过Lonza的SAGM BulletKit)和EGM-2试剂盒可以用于内皮细胞(例如通过Lonza的EGM-2 BulletKit)。可以使用针对接种的内皮细胞类型定制的培养基(例如通过增加或降低生长因子如VEGF),如例如Brudno, Y.等人,Biomaterials 2013,34:9201-9中所述的。在内皮细胞的情况下,可以使用一系列不同的培养基组合物来诱导细胞的接种、扩增、植入和成熟的不同阶段。例如,在第一阶段,细胞接种的构建体可以用‘血管生成培养基’灌注2-30天,以增加内皮细胞扩增、迁移和代谢。该培养基的特征在于高浓度)细胞因子,例如以5-100ng/ml的VEGF和以5-100ng/ml的bFGF,以及通过激活蛋白激酶C来激活血管生成途径的佛波醇肉豆蔻酸酯乙酸酯(phorbol myristate acetate) (PMA),例如5-100ng/ml PMA,和刺激内皮细胞出芽的Ang-1的存在。在第二阶段,细胞接种的构建体然后可以用支持内皮成熟和紧密连接形成的‘紧固培养基(tightening media)’进行灌注。紧固培养基具有较低水平的细胞因子,其基本组成与血管生成培养基相同,但具有降低水平的VEGF、bFGF和PMA(0.1-5ng/ml VEGF、FGF和PMA)。促进紧密连接形成并显示减少肺水肿的氢化可的松,可以进一步添加到紧固培养基中,以促进血管成熟。进一步的促成熟因子如PDGF和Ang-2可以添加到紧固培养基中,以增强血管形成。可以滴定这些因子的浓度,以支持不同的血管大小。培养基更换可以逐渐地执行,以避免细胞因子突然变化的不利效应。类似于内皮细胞支持培养基,连续培养基变化可以用于指导上皮细胞命运。初始培养基可以含有例如以10-200ng/ml的激活素A和以0.01-1uM的Pi3K抑制剂(例如ZSTK 474),以诱导定型内胚层,随后为以0.1-10uM的TGF- β 抑制剂(例如A-8301)和以0.05-1uM的BMP4拮抗剂(例如DMH-1),以诱导前化内胚层,且最后为以1-100ug/ml的BMP4、以10-500ng/ml的FGF2、以10-500nM的GSK-3 β 抑制剂(例如CHIR 99021)、以1-100nM的PI3K抑制剂(例如PIK-75)和以1-100nM的氨甲蝶呤,以诱导肺祖细胞的生成。

[0213] 可以使用任何适当的方法来分离和收集用于接种的细胞。例如,诱导多能干细胞一般可以通过转录因子如Oct4、Sox2、Klf4、c-MYC、Nanog和Lin28的异位表达,从“重新编程”为多能状态的体细胞获得。参见Takahashi等人,Cell 2007,131:861-72(2007);Park等人,Nature 451:141-146(2008);Yu等人,Science 318:1917-20;Zhu等人,Cell Stem Cell 2010,7:651-5;和Li等人,Cell Res.2011,21:196-204;Malik和Rao,Methods Mol Biol.2013;997:23-33;Okano等人,Circ Res.2013年2月1日:112(3):523-33;Lin和Ying,Methods Mol Biol.2013,936:295-312。外周血衍生的单核细胞可以从患者的血液样品中分离,并用于生成诱导多能干细胞。在其它实例中,诱导多能干细胞可以通过用构建体重新编程来获得,所述构建体针对Oct4、Sox2、Klf4、c-MYC与小分子如转化生长因子 β

(SB431542)、MEK/ERK (PD0325901) 和Rho激酶信号传导(Thiazovivin)结合的高共表达进行优化。参见GroB等人, Curr Mol Med. 2013, 13:765-76和Hou等人, Science 2013, 341:651-4。从干细胞生成内皮细胞的方法在Reed等人, Br J Clin Pharmacol. 2013, 75(4):897-906中进行综述。脐带血干细胞可以从新鲜或冷冻的脐带血中分离。间充质干细胞可以从例如原始未纯化的骨髓或聚蔗糖纯化的骨髓中分离。根据本领域已知的方法, 可以从活体或尸体供体(例如从将接受生物人工肾或肺的受试者)中分离且收集上皮细胞和内皮细胞。例如, 上皮细胞可以从皮肤组织样品(例如穿刺活组织检查)中获得, 而内皮细胞可以从血管组织样品中获得。在一些实施方案中, 蛋白水解酶通过置于脉管系统中的导管灌注到组织样品内。酶促处理的组织的一部分可以经受进一步的酶促和机械破坏。以这种方式获得的细胞混合物可以进行分离, 以纯化上皮细胞和内皮细胞。在一些情况下, 基于特定细胞表面标记物的存在或不存在, 基于流式细胞术的方法(例如荧光激活细胞分选)可以用于对细胞进行分选。此外, 肾或肺细胞(例如上皮细胞、间充质细胞和内皮细胞)可以从肾或肺活组织检查获得, 所述肾或肺活组织检查可以例如经由经支气管和支气管内活组织检查或者经由肾或肺组织的手术活组织检查获得。在其中使用非自体细胞的情况下, 应当考虑选择免疫类型匹配的细胞, 使得器官或组织在植入受试者内时不被排斥。

[0214] 在一些情况下, 如本文提供的脱细胞或人工肾或肺组织基质可以通过灌注接种用细胞类型进行接种。例如, 流动灌注系统可以经由保存在组织基质中的血管系统(例如通过动脉线)用于接种脱细胞肾或肺组织基质。在一些情况下, 可以在适当的条件下使用自动流动灌注系统。此类灌注接种方法可以改善接种效率并提供细胞在组合物各处的更均匀分布。定量生化和图像分析技术可以用于评价在静态或灌注接种方法之后, 所接种的细胞的分布。

[0215] 在一些情况下, 可以用一种或多种生长因子浸渍组织基质, 以刺激接种的再生细胞的分化。例如, 组织基质可以用对于本文提供的方法和材料适当的生长因子进行浸渍, 所述生长因子例如血管内皮生长因子(VEGF)、TGF- β 生长因子、骨形态发生蛋白(例如BMP-1、BMP-4)、血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)例如FGF-10、胰岛素样生长因子(IGF)、表皮生长因子(EGF)或生长分化因子-5(GDF-5)。参见例如, Desai和Cardoso, Respire. Res. 2002, 3:2。这些生长因子可以被封装, 以控制时间释放。可以用不同的生长因子增强支架的不同部分, 以增加生长因子刺激的空间控制。在一些情况下, 在再生细胞接种之前, 可以用细胞外基质组分(例如层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原、弹性蛋白)浸渍组织基质, 以支持再生细胞的附着和生长。在一些情况下, 在再生细胞接种之前, 可以用分离的线粒体浸渍组织基质, 以支持再生细胞的代谢、附着和活力。

[0216] 接种的组织基质可以在接种后温育一段时间(例如从几个小时到约14天或更长时间), 以改善细胞在组织基质中的固定和渗透。接种的组织基质可以维持在其中至少一些再生细胞可以在无细胞组织基质内和其上增殖和/或分化的条件下。此类条件可包括但不限于适当的温度(35-38摄氏度)和/或压力(例如大气压)、电和/或机械活性(例如经由正压或负压通气, 其中呼气末正压为1-20cmH₂O, 平均气道压力为5-50cmH₂O, 且吸气峰压为5-65cmH₂O), 适当量的流体例如O₂(1-100%FiO₂)和/或CO₂(0-10%FiCO₂)、适当量的湿度(10-100%)和无菌或接近无菌的条件。此类条件还可以包括湿通气、湿到干通气和干通气。在一些情况下, 可以将营养补充剂(例如营养素和/或碳源如葡萄糖)、外源性激素或生长因子添

加到接种的组织基质中。可以执行组织学和细胞染色,以测定接种细胞的繁殖。可以执行任何适当的方法,以测定接种细胞的分化。

[0217] 因此,本文所述的方法可以用于生成可移植的生物人工器官或组织,例如用于移植到人受试者内的人工肾或肺。可移植的器官或组织将优选地保留可以连接到患者的血管系统的足够完整的脉管系统。

[0218] IV. 治疗受试者的方法

[0219] 本文公开了用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,该方法包括向受试者或供体肺施用药物组合物,所述药物组合物包含已用分离的线粒体预处理的间充质干细胞或内皮祖细胞、或者从间充质干细胞或内皮祖细胞中分离的细胞外囊泡。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者或供体肺同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者或供体肺自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在一些实施方案中,组合物通过肺气道施用于受试者或供体肺。在其它实施方案中,组合物通过注射(例如静脉内、皮下、腹膜内和肌肉内注射)施用于受试者或供体肺。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0220] 药学上可接受的载体或赋形剂的非限制性实例是呼吸缓冲液(例如含有蔗糖、谷氨酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐和ADP的缓冲液);细胞外基质组分(例如层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原(collage)、弹性蛋白);器官或组织保存溶液(例如Euro-Collins溶液);等渗盐水;水;平衡盐溶液;右旋糖水溶液;多元醇(例如甘油、丙二醇、液态聚乙二醇等等);和植物油。本领域技术人员可以参考参考手册“Handbook of Pharmaceutical Excipients”, American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press;第6次修订版,2009)。此外,本领域技术人员可以从已知适于制备预期用于注射或吸入的组合物用于药物用途的载体和赋形剂中选择载体或赋形剂。适合于注射用途的药物剂型包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,形式都可以流动至存在可容易注射性的程度。需要时,可以使用各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。

[0221] 活性成分的非限制性实例是曲前列尼尔、抗氧化剂、抗组胺剂、免疫调节剂、生物添加剂、镇痛剂、麻醉剂、抗生素、抗真菌剂、UNEX-42和抗炎剂。在某些实施方案中,活性成分是药物活性成分并发挥疗效。

[0222] 本文还公开了用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,该方法包括向受试者或供体肺施用(A)间充质干细胞或内皮祖细胞、或者从间充质干细胞或内皮祖细胞中分离的细胞外囊泡,和(B)分离的线粒体,其中(A)和(B)包含在单一药物组合物或两种分开的药物组合物中。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者或供体肺同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者或供体肺自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在其它实施方案中,组合物通过肺气道施用于受试者或供体肺。在其它实施方案中,组合物通过注射(例

如静脉内、皮下、腹膜内和肌内)施用于受试者或供体肺。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0223] 本文还公开了治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症的方法,该方法包括:(i)向受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,并且(ii)施用治疗有效量的用于治疗肺疾病或病症的药物,其中在用于治疗肺疾病或病症的药物施用之前、同时或之后,将组合物施用于受试者。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在其它实施方案中,组合物通过注射施用于受试者。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0224] 肺疾病和病症的非限制性实例是肺高血压、支气管肺发育不良(BPD)、肺纤维化、哮喘、睡眠呼吸障碍或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。

[0225] 肺高血压的非限制性实例是由于COPD的肺高血压、慢性血栓栓塞性肺高血压(CTEPH)、肺动脉高压(PAH)、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)、肺毛细血管瘤病(PCH)、新生儿持续性肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。

[0226] 用于治疗肺疾病或病症例如肺高血压的药物的非限制性实例是曲前列尼尔(treprostinil)、依前列醇(epoprostenol)、伊洛前列素(iloprost)、波生坦(bosentan)、安立生坦(ambisentan)、马西替坦(macitentan)和西地那非(sildenafil)。

[0227] 本文还公开了用于治疗有此需要的受试者中的肺高血压的方法,该方法包括:(i)向受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,并且(ii)施用治疗有效量的曲前列尼尔,其中在曲前列尼尔施用之前、同时或之后,将组合物施用于受试者。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在其它实施方案中,组合物通过注射施用于受试者。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0228] UNEX-42是一种由人间充质干细胞分泌的细胞外囊泡制剂。本文还公开了用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,该方法包括(i)向受试者或供体肺施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,并且(ii)向受试者或供体肺施用治疗有效量的UNEX-42,其中在UNEX-42施用之前、同时或之后,向受试者或供体肺施用组合物。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在其它实施方案中,组合物通过肺气道施用于受试者或供体肺。在其它实施方案中,组合物通过注射施用于受试者或供体肺。在一些实施方案中,组合物进一步

包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0229] 本文还公开了用于治疗有此需要的受试者中的肺疾病或病症、或者用于在移植之前或之后改善供体肺的功能的方法,该方法包括:(i)向受试者或供体肺施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物,并且(ii)向受试者或供体肺施用治疗有效量的抗氧化剂,其中在抗氧化剂施用之前、同时或之后,向受试者或供体肺施用组合物。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,抗氧化剂是n-乙酰半胱氨酸、tempol或白藜芦醇(resveratrol)。在一些实施方案中,抗氧化剂与包含分离的线粒体的组合物同时和作为组合物的部分施用于受试者或供体肺。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在其它实施方案中,组合物通过肺气道施用于受试者或供体肺。在其它实施方案中,组合物通过注射施用于受试者或供体肺。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0230] 本文还公开了用于治疗受试者中的肺疾病或病症的急性加重的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含分离的线粒体的组合物用于救援疗法。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,肺疾病或病症是肺高血压、哮喘、睡眠呼吸障碍、BPD、COPD或肺纤维化。在一些实施方案中,肺高血压是新生儿肺高血压、BPD诱发性肺高血压、左心疾病继发性肺高血压、由于肺疾病的肺高血压、慢性缺氧、慢性动脉阻塞、或者具有不明机制或多因素机制的肺高血压。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试者。在其它实施方案中,组合物通过注射施用于受试者。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0231] 本文还公开了治疗有此需要的受试者中的急性肾损伤的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的包含分离的线粒体的组合物。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,施用治疗有效量的组合物减少受试者中的一种或多种促炎细胞因子或促炎介质的血清水平。在一些实施方案中,一种或多种促炎细胞因子或促炎介质选自:单核细胞趋化蛋白1(MCP1)、C3A和C5a。在一些实施方案中,施用治疗有效量的组合物减少受试者中的肾损伤分子-1(KIM1)血清水平。在一些实施方案中,施用治疗有效量的组合物减少受试者中的尿素氮(BUN)水平。在一些实施方案中,施用治疗有效量的组合物减少受试者中的肾重量。

[0232] 本文还公开了用于治疗处于心脏骤停或经历复苏的受试者的方法,该方法包括向受试者施用有效量的包含分离的线粒体的组合物,以促进其运输到医疗设施或医学治疗。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,组合物通过吸入施用于受试

者。在其它实施方案中,组合物通过注射施用于受试者。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0233] 本文还公开了减轻有此需要的受试者中的炎症的方法,该方法包括:(i)将分离的线粒体递送至从受试者中分离的造血谱系细胞,并且(ii)将用分离的线粒体处理的造血谱系细胞施用于受试者。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应造血细胞相比,用分离的线粒体处理的造血谱系细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0234] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至造血谱系细胞的步骤之前,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入分离的造血谱系细胞内的步骤。在其它实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至造血谱系细胞的步骤之后,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入分离的造血谱系细胞内的步骤。

[0235] 在一些实施方案中,分离的造血谱系细胞是髓样细胞、髓样前体细胞或其组合。在一些实施方案中,造血谱系细胞从受试者的外周血中分离。在一些实施方案中,在从外周血中分离造血谱系细胞之前,受试者已用干细胞动员剂进行治疗。在优选的实施方案中,干细胞动员剂是粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。在其它实施方案中,造血谱系细胞从受试者的骨髓中分离。

[0236] 用于从受试者的血液或器官组织中分离和富集细胞亚群的技术是本领域已知的,并且包括诸如流式细胞术、密度离心和磁分离的技术(参见例如,Salvagno,C.和de Visser,K.E.,Methods Mol Biol.2016;1458:125-35,其以引用方式整体并入)。

[0237] 用于确定蛋白质(例如重组蛋白)的水平和活性的各种测定是可用的,例如扩增/表达方法、免疫组织化学方法、FISH和脱落抗原测定、DNA印迹、蛋白质印迹或PCR技术。此外,蛋白质表达或扩增可以使用体内诊断测定进行评估,例如通过施用结合待检测蛋白质并用可检测标记(例如放射性同位素)加上标签的分子(例如抗体),并从外部扫描患者用于定位所述标记。因此,测量细胞中的蛋白质水平的水平的方法是本领域一般已知的,并且可以用于评价与本文提供的方法和组合物结合的蛋白质水平和/或活性(适用时)。这些测定可以用于确定修饰对由转基因编码的重组蛋白的效应。例如,这些测定可以用于确定修饰是否导致不能产生正常水平或全功能基因产物的转基因、或者确认包含全部或部分重组蛋白的突变的转基因。

[0238] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至分离的造血谱系细胞的步骤之前,使分离的造血谱系细胞离体分化的步骤。在其它实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至分离的造血谱系细胞的步骤之后,使分离的造血谱系细胞离体分化的步骤。在一些实施方案中,分离的造血谱系细胞离体分化成具有M1或M2表型的巨噬细胞。

[0239] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应造血谱系细胞相比,用分离的线粒体处理的造血谱系细胞具有NF- κ B的减少表达。在特别优选的实施方案中,与未用

分离的线粒体处理的相应造血谱系细胞相比,用分离的线粒体处理的造血谱系细胞具有促炎细胞因子和趋化因子的减少分泌,所述促炎细胞因子和趋化因子例如MIP-1 β (CCL4)、PDGF-BB、RANTES (CCL5)、可溶性ICAM-1 (sICAM-1)、M-CSF (CSF-1)、IL-1 β 、IL-6、IL-8 (CXCL8)、GDF-15、TGF- β 1或其任何组合。

[0240] 在一些实施方案中,将用分离的线粒体处理的分离的造血谱系细胞通过注射施用于受试者。在一些实施方案中,将用分离的线粒体处理的分离的造血谱系细胞作为微载体的部分施用于受试者。在一些实施方案中,微载体包被在基质中,所述基质优选具有细胞外组分。在一些实施方案中,微载体是带正电的。

[0241] 髓样细胞或髓样前体细胞的非限制性实例是单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、造血干细胞和髓样祖细胞。

[0242] V. 保存器官、组织、肢体或其它身体部位的方法

[0243] 本文公开了保存用于运输和移植的组织或器官的方法,该方法包括将分离的线粒体递送至预期用于运输和移植的组织或器官,其中所述组织或器官从已故供体获得。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于已故供体同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于已故供体自体的分离的人线粒体。

[0244] 在一些实施方案中,将分离的线粒体在供体死亡后24小时内递送至组织或器官。在其它实施方案中,将分离的线粒体在供体死亡后12小时内递送至组织或器官。在其它实施方案中,将分离的线粒体在供体死亡后4小时内递送至组织或器官。

[0245] 在一些实施方案中,该方法进一步包括通过从已故供体中收获组织或器官,从已故供体获得组织或器官的步骤。在一些实施方案中,在从已故供体中收获组织或器官之前,将分离的线粒体递送至组织或器官。在其它实施方案中,在从已故供体中收获组织或器官之后,将分离的线粒体递送至组织或器官。在一些实施方案中,将分离的线粒体通过注射递送至组织或器官。在一些实施方案中,组织或器官是心脏、肝、肺、血管、输尿管、气管、皮片或肾。在优选的实施方案中,组织或器官是人组织或器官。

[0246] 在优选的实施方案中,组织或器官是肺。在一些实施方案中,将分离的线粒体通过气道、静脉内或动脉内递送至肺。在其它实施方案中,将分离的线粒体在EVLV期间递送至肺。在特别优选的实施方案中,肺是人肺。在其它优选的实施方案中,组织或器官是肾。在一些实施方案中,将分离的线粒体静脉内或动脉内递送至肾。

[0247] 本文还公开了保存由于创伤性截肢而丢失的肢体或其它身体部位的方法,该方法包括在肢体或其它身体部位的创伤性截肢之后,将分离的线粒体递送至肢体或其它身体部位。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于肢体或其它身体部位同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于肢体或其它身体部位自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,在创伤性截肢后不迟于15分钟、30分钟、1小时、4小时、8小时、12小时或24小时,将分离的线粒体递送至被截肢的肢体或其它身体部位。在一些实施方案中,将分离的线粒体通过注射递送至被截肢的肢体或其它身体部位。在优选的实施方案中,肢体或其它身体部位是人的肢体或其它身体部位。

[0248] VI. 改善细胞功能和细胞疗法的方法

[0249] 本文公开了改善分离的细胞的细胞功能的方法,该方法包括将分离的线粒体递送至分离的细胞。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于分离的细胞同种异体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。

[0250] 在优选的实施方案中,分离的细胞是人细胞。在特别优选的实施方案中,分离的细胞是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、免疫细胞(例如造血谱系细胞)、间充质细胞、周细胞及其任何组合。

[0251] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有增加的细胞外囊泡分泌。在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有改变的细胞外囊泡组成。在优选的实施方案中,改变的细胞外囊泡组成在蛋白质含量、核酸含量、脂质含量或其任何组合方面是改变的。

[0252] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至分离的细胞的步骤之前,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入分离的细胞内的步骤。在其它实施方案中,该方法包括在将分离的线粒体递送至分离的细胞的步骤之后,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入分离的细胞内的步骤。在优选的实施方案中,异源蛋白质由细胞外囊泡中的细胞分泌。

[0253] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的自噬、减少的线粒体自噬、减少的衰老、减少的线粒体应激信号传导、减少的细胞损害、减少的细胞炎症、减少的活性氧产生、增加的细胞屏障功能、增加的血管生成、增加的细胞粘附、增加的生长动力学或其任何组合。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1、MCL-1或其任何组合的表达增加相关。

[0254] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加相关。

[0255] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有在二维或三维细胞支持物上的改善的细胞粘附和生长动力学。在一些实施方案中,二维或三维细胞支持物是微载体。在一些实施方案中,二维或三维细胞支持物包

含一种或多种细胞外基质组分。

[0256] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞在冷缺血或冷储存中维持活力更久。

[0257] 分离的细胞的非限制性实例:上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞(例如造血谱系细胞)、间充质细胞、周细胞、神经元细胞及其任何组合。

[0258] 本文还公开了改善有此需要的受试者中的细胞疗法的方法,该方法包括:(i)在体外将分离的线粒体递送至分离的细胞,并且(ii)将用分离的线粒体处理的细胞施用于受试者。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于受试者自体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,该方法进一步包括在体外将分离的线粒体递送至分离的细胞的步骤之前,从受试者中分离自体细胞的步骤。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在优选的实施方案中,受试者是人受试者。

[0259] 在一些实施方案中,分离的细胞是同种异体细胞。在其它实施方案中,分离的细胞是自体细胞。在优选的实施方案中,分离的细胞是人细胞。在特别优选的实施方案中,分离的细胞是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞(例如造血谱系细胞)、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

[0260] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有增加的细胞外囊泡分泌。在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有改变的细胞外囊泡组成。在优选的实施方案中,改变的细胞外囊泡组成在蛋白质含量、核酸含量、脂质含量或其任何组合方面是改变的。

[0261] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至分离的细胞的步骤之前,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入分离的细胞内的步骤。在其它实施方案中,该方法进一步包括在将分离的线粒体递送至分离的细胞的步骤之后,将编码至少一种异源蛋白质的转基因引入分离的细胞内的步骤。在优选的实施方案中,异源蛋白质由细胞外囊泡中的细胞分泌。

[0262] 在一些实施方案中,将用分离的线粒体处理的细胞通过注射施用于受试者。在其它实施方案中,将用分离的线粒体处理的细胞通过气道施用于受试者。在一些实施方案中,将用分离的线粒体处理的细胞作为微载体的部分施用于受试者。

[0263] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,处理的细胞具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的自噬、减少的线粒体自噬、减少的衰老、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生、减少的细胞损害、减少的细胞炎症、增加的细胞屏

障功能、增加的血管生成、增加的细胞粘附、增加的生长动力学或其任何组合。在优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达或其任何组合相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1、MCL-1或其任何组合的表达增加相关。

[0264] 在一些实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,处理的细胞具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少80%相关。

[0265] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有在二维或三维细胞支持物上的改善的细胞粘附和生长动力学。在一些实施方案中,二维或三维细胞支持物是微载体。在一些实施方案中,二维或三维细胞支持物包含一种或多种细胞外基质组分。

[0266] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞在冷缺血中维持活力更久。

[0267] VII. 用于改善分离的细胞的冷运输、运送和储存的方法

[0268] 本文还公开了用于改善分离的细胞的冷运输、冷运送或冷储存的方法,该方法包括在冷运输、冷运送或冷储存之前、期间或之后,将分离的线粒体递送至分离的细胞,其中与未用分离的线粒体处理的相应细胞的细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的活力改善。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于细胞同种异体的分离的人线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是对于细胞自体的分离的人线粒体。在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞的细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善。在优选的实施方案中,分离的细胞是人细胞。在特别优选的实施方案中,分离的细胞是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、免疫细胞(例如造血谱系细胞)、间充质细胞或周细胞。

[0269] 在优选的实施方案中,与未用分离的线粒体处理的相应细胞相比,用分离的线粒体处理的细胞具有减少的ROS介导的氧化副产物产生、改善的细胞活力、减少的坏死、减少的细胞裂解、增加的细胞ATP的总水平、减少的炎性细胞因子分泌或其任何组合。在一些实施方案中,炎性细胞因子包含IL-6、IL-8和IFN- γ 。在一些实施方案中,ROS介导的氧化副产物包含4-HNE和8-OHdG。

[0270] 在一些实施方案中,该方法进一步包括冷冻保存用分离的线粒体处理的人细胞的步骤。在优选的实施方案中,用分离的线粒体处理的人细胞通过阶梯式降压液氮冷冻(step-down liquid N₂ freezing)进行冷冻保存。在一些实施方案中,用分离的线粒体处理的细胞维持在包含脂质、蛋白质、糖类、寡糖、多糖或其任何组合的溶液中。在优选的实施方案中,用分离的线粒体处理的细胞维持在包含海藻糖、蔗糖、甘油、PlasmaLyte、CryoStor、二甲亚砜、脂质、谷氨酸盐、PEG、PVA、白蛋白或其任何组合的溶液中。在特别优选的实施方案中,分离的线粒体存在于溶液中。可以在冷冻保存人细胞的步骤之前、在冷冻保存人细胞的步骤期间、在从冷冻保存解冻时或其任何组合,将分离的线粒体递送至人细胞。

[0271] 在一些实施方案中,分离的细胞是同种异体细胞。在其它实施方案中,分离的细胞是自体细胞。在优选的实施方案中,分离的细胞是人细胞。在特别优选的实施方案中,分离的细胞是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞(例如造血谱系细胞)、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

[0272] VIII. 用于保存分离的线粒体的方法

[0273] 本文公开了冷冻保存分离的线粒体例如猪线粒体的方法,其包括在包含冷冻保护剂的冷冻缓冲液中冷冻分离的线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的人线粒体。在一些实施方案中,该方法进一步包括从细胞或组织中分离线粒体。在一些实施方案中,冷冻保护剂是脂质、蛋白质、糖类、二糖、寡糖、多糖或其任何组合。在一些实施方案中,分离的线粒体使用等渗缓冲液在生理pH下储存,并且可以任选地包括多肽、蛋白质或其它试剂,以保存线粒体膜的完整性。例如,冷储存缓冲液可以具有7.0至7.5,例如约7.2、7.35或7.4的pH。在优选的实施方案中,冷冻保护剂是海藻糖、蔗糖、甘油、PlasmaLyte、CryoStor、DMSO、谷氨酸盐、PEG、PVA、白蛋白或其任何组合。在一些实施方案中,分离的线粒体通过阶梯式降压液氮冷冻进行冷冻保存。在一些实施方案中,海藻糖或其它冷冻保护剂可以以100-500mM、200-400mM、250-350mM或275-325mM的量存在。线粒体可以保持在-20℃或更低、-40℃或更低、-60℃或更低、-70℃或更低、或者-80℃或更低的温度下。

[0274] 在一些实施方案中,该方法进一步包括解冻冷冻的分离的线粒体,并且通过测量以下一项或多项,来评价解冻的分离的线粒体的健康和/或功能:线粒体肿胀、线粒体膜转换孔(mPTP)开口、线粒体呼吸、线粒体膜电位、线粒体完全通透性和线粒体肿胀。在一些优选的实施方案中,线粒体是猪线粒体。在其它实施方案中,该方法进一步包括解冻冷冻的分离的线粒体,并且通过对线粒体总体形态进行评分和/或测量平均线粒体大小,来评价解冻的分离的线粒体的健康和/或功能。在一些实施方案中,可以使用诸如流式细胞术的技术,基于预定义的标准对解冻的分离的线粒体进行分选,以便仅分离健康和/或功能性线粒体。

[0275] 本文还公开了用于长期储存分离的线粒体例如猪线粒体的方法,该方法包括:(i)从细胞或组织中分离线粒体,(ii)将分离的线粒体悬浮于冷储存缓冲液中,(iii)在约-70℃至约-100℃的温度下,在冷储存缓冲液中冷冻分离的线粒体,并且(iv)将冷冻的分离的线粒体在约-70℃至约-100℃的温度下维持24小时或更长时间。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的猪线粒体。在一些实施方案中,分离的线粒体是分离的人线粒体。

[0276] 在一些实施方案中,该方法包括在约-70℃至约-100℃的温度下,在冷储存缓冲液中冷冻分离的线粒体,并且将冷冻的分离的线粒体在约-70℃至约-100℃的温度下维持24小时或更长时间。在优选的实施方案中,在冷储存缓冲液中的分离的线粒体在约-75℃至约-95℃的温度下冷冻,并且其中冷冻的分离的线粒体维持在约-75℃至约-95℃的温度下。在特别优选的实施方案中,在冷储存缓冲液中的分离的线粒体在约-80℃至约-90℃的温度下冷冻,并且其中冷冻的分离的线粒体维持在约-80℃至约-90℃的温度下。在一些实施方案中,冷储存缓冲液包含海藻糖、蔗糖、甘油、CryoStor或其任何组合。在优选的实施方案中,冷储存缓冲液是等渗的并且具有约7.0至约7.5的pH。在特别优选的实施方案中,冷储存缓冲液是等渗的并且具有约7.2的pH。在特别优选的实施方案中,冷储存缓冲液包含海藻糖。在特别优选的实施方案中,冷储存缓冲液包含300mM海藻糖、10mM HEPES、10mM KCl、1mM EGTA、0.1%不含脂肪酸的BSA。在一些实施方案中,冷冻的分离的线粒体在所述温度下维持1周或更长时间。在一些实施方案中,冷冻的分离的线粒体在所述温度下维持1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年或更长时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括:(v)解冻冷冻的分离的线粒体,并且(vi)通过测量以下一项或多项,来评价解冻的分离的线粒体的健康和/或功能:线粒体肿胀、线粒体膜转换孔(mPTP)开口、线粒体呼吸、线粒体膜电位、线粒体完全通透性和线粒体肿胀。在一些实施方案中,该方法进一步包括:(v)解冻冷冻的分离的线粒体,(vi)通过使用流式细胞术测量线粒体肿胀,来评价解冻的分离的线粒体的健康,并且(vii)使用流式细胞术辅助的细胞分选,使健康的线粒体与具有肿胀表型的线粒体分离。在其它实施方案中,该方法进一步包括:(v)解冻冷冻的分离的线粒体,并且(vi)通过对线粒体总体形态进行评分和/或测量平均线粒体大小,来评价解冻的分离的线粒体的健康。在一些优选的实施方案中,线粒体是猪线粒体。

[0277] IX. 用于检测人细胞中的猪线粒体的方法

[0278] 本文公开了用于检测人细胞、组织或器官样品中的猪线粒体的方法,该方法包括在体外或离体检测人细胞、组织或器官样品中的核酸标记物的存在,其中所述核酸标记物包含线粒体DNA或RNA的序列,并且其中核酸标记物存在于猪线粒体中而不存在于人线粒体中。在优选的实施方案中,该方法进一步包括定量人细胞、组织或器官样品中的核酸标记物的量。

[0279] 在一些实施方案中,该方法进一步包括通过聚合酶链反应(PCR)扩增核酸标记物的步骤。在一些实施方案中,使用引物对通过PCR检测核酸标记物的存在,其中引物对的至少一个引物与核酸标记物特异性杂交。在其它实施方案中,使用与核酸标记物特异性杂交的核酸探针检测核酸标记物的存在。

[0280] X. 包含具有外源性线粒体的人细胞的组合物

[0281] 本文公开了包含人细胞的组合物,其中所述人细胞的胞质溶胶包含外源性线粒体,其中与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,组合物的人细胞具有至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的线粒体功能改善,并且其中所述改善的线粒体功能是至少1%、或至少2%、或至少5%、或至少10%、或至少20%、或至少50%、或至少100%的耗氧量增加和/或ATP合成增加。在一些实施方案中,外源性线粒体是猪线粒体。在一些实施方案中,外源性线粒体是对于人细胞同种异体的人线粒

体。在一些实施方案中,外源性线粒体衍生自猪心。在一些实施方案中,人细胞是上皮细胞(例如I型肺泡细胞、II型肺泡细胞、小气道上皮细胞和大气道上皮细胞)、内皮细胞(例如人肺动脉内皮细胞(HPAEC))、成纤维细胞、祖细胞(例如内皮祖细胞和间充质干细胞)、平滑肌细胞(例如肺动脉平滑肌细胞)、骨骼肌细胞、心肌细胞、肝细胞、免疫细胞(例如造血谱系细胞)、间充质细胞、周细胞、神经元细胞或其任何组合。

[0282] 在一些实施方案中,与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,人细胞具有增加的细胞外囊泡分泌。在一些实施方案中,与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,人细胞具有改变的细胞外囊泡组成。在优选的实施方案中,改变的细胞外囊泡组成在蛋白质含量、核酸含量、脂质含量或其任何组合方面是改变的。

[0283] 在一些实施方案中,人细胞进一步包含编码至少一种异源蛋白质的转基因。在一些实施方案中,转基因的转录在人细胞的核中发生。在一些实施方案中,转基因稳定整合到人细胞的核DNA中。在优选的实施方案中,异源蛋白质由细胞外囊泡中的人细胞分泌。在其它实施方案中,转基因的转录在外源性线粒体中发生。在一些实施方案中,转基因稳定整合到外源性线粒体的线粒体DNA(mtDNA)中。

[0284] 在优选的实施方案中,与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,人细胞在冷缺血或冷储存中维持活力更久。

[0285] 在优选的实施方案中,与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,人细胞具有减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的自噬、减少的线粒体自噬、减少的衰老、减少的线粒体应激信号传导、减少的活性氧产生、减少的细胞炎症、减少的细胞损害、增加的细胞粘附、增加的细胞屏障功能、增加的血管生成、增加的生长动力学或其任何组合。在特别优选的实施方案中,减少的细胞损害与减少的TLR9表达、改变的H0-1表达、减少的胞质mtDNA或其任何组合相关。在一些实施方案中,改变的H0-1表达是在冷暴露后增加的H0-1表达。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡、增加的细胞活力、减少的线粒体应激信号传导和/或减少的细胞损害与减少的NF- κ B、MAPK14、JNK、p53表达相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与减少的促凋亡标记物表达相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与促凋亡引发剂(BIM、PUMA)、促凋亡效应物(BAX、BAK)、促凋亡因子(SMAC、DIABLO、BID、BAD等)或其任何组合的表达减少相关。在优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与增加的抗凋亡标记物表达相关。在特别优选的实施方案中,减少的细胞凋亡与BCL-2、BCL-XL、BCL-W、A1/BFL-1、MCL-1或其任何组合的表达增加相关。

[0286] 在一些实施方案中,与未用外源性线粒体处理的相应人细胞相比,人细胞具有增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生。在优选的实施方案中,增加的葡萄糖摄取和降低的乳酸盐产生与HK、VDAC1、GLUT、AKT1或其任何组合的表达增加相关。

[0287] 在优选的实施方案中,与缺乏外源性线粒体的相应人细胞相比,人细胞具有在二维或三维细胞支持物上的改善的细胞粘附和生长动力学。在一些实施方案中,组合物进一步包含二维或三维细胞支持物。在一些实施方案中,二维或三维细胞支持物是微载体。在一些实施方案中,二维或三维细胞支持物包含一种或多种细胞外基质组分。

[0288] 在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物进一步包含至少一种活性成分。

[0289] 本文所述的分离的多肽和重组蛋白可以通过本领域已知的任何合适的方法产生。

此类方法的范围从直接蛋白质合成方法到构建编码分离的多肽序列的DNA序列并在合适的转化宿主中表达这些序列。在一些实施方案中,使用重组技术通过分离或合成编码目的野生型蛋白质的DNA序列来构建DNA序列。任选地,序列可以通过位点特异性诱变进行诱变,以提供其功能类似物。参见例如,Mark,D.F.等人,Proc Natl Acad Sci USA.1984年9月;81(18):5662-6和美国专利号4,588,585(其以引用方式整体并入本文)。

[0290] 可以使用寡核苷酸合成仪通过化学合成来构建编码一种或多种目的多肽(例如重组蛋白)的DNA序列(例如转基因)。此类寡核苷酸可以基于所需多肽的氨基酸序列并选择在其中将产生目的多肽的宿主细胞中偏好的那些密码子进行设计。可以应用标准方法来合成编码分离的目的多肽的分离的多核苷酸序列。例如,完整的氨基酸序列可以用于构建反向翻译的基因。进一步地,可以合成含有编码特定分离多肽的核苷酸序列的DNA寡聚体。例如,可以合成编码所需多肽的各部分的几个小寡核苷酸,然后连接。各个寡核苷酸通常含有5'或3'突出端,用于互补组装。

[0291] 一旦组装(通过合成、定点诱变或另一种方法),编码特定分离的目的多肽的多核苷酸序列将被插入表达载体内,并且与对于在所需宿主中表达蛋白质适当的表达控制序列可操作地连接。适当的组装可以通过核苷酸测序、限制酶切作图和生物活性多肽在合适宿主中的表达来确认。如本领域已知的,为了在宿主中获得转染基因的高表达水平,可以将基因可操作地连接到在所选表达宿主中功能性的转录和翻译表达控制序列。

[0292] 在某些实施方案中,重组表达载体用于扩增和表达编码一种或多种目的多肽(例如重组蛋白)的DNA(例如转基因)。重组表达载体是可复制的DNA构建体,其具有编码目的多肽的合成或cDNA衍生的DNA片段,其可操作地连接到衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录或翻译调控元件。转录单位一般包含以下的组装体:(1)在基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件,例如转录启动子或增强子,(2)被转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列,和(3)适当的转录和翻译起始和终止序列,如下文详述的。此类调控元件可以包括控制转录的操纵子序列。可以另外掺入通常由复制起点赋予的在宿主中复制的能力,以及促进转化体识别的选择基因。当DNA区域在功能上彼此相关时,它们是可操作地连接的。例如,如果关于信号肽(分泌前导区)的DNA作为参与多肽分泌的前体表达,则它与关于多肽的DNA可操作地连接;如果启动子控制序列的转录,则启动子与编码序列可操作地连接;或如果核糖体结合位点这样放置以便允许翻译,则它与编码序列可操作地连接。预期用于酵母表达系统中的结构元件包括允许通过宿主细胞的翻译蛋白的细胞外分泌的前导序列。可替代地,当重组蛋白在没有前导序列或转运序列的情况下表达时,它可以包括N-末端甲硫氨酸残基。该残基随后可以任选地从表达的重组蛋白中切下,以提供最终产物。

[0293] 表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可以采用广泛各种表达宿主/载体组合。用于真核宿主的有用表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头状瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用表达载体包括已知的细菌质粒,例如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物,更广泛的宿主范围质粒,例如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0294] 用于表达一种或多种目的多肽的合适宿主细胞包括在适当启动子的控制下的原核细胞、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大

肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括建立的哺乳动物起源的细胞系,如下所述。也可以采用无细胞翻译系统。通过Pouwels等人(Cloning Vectors:A Laboratory Manual,Elsevier, N.Y.,1985)描述了用于与细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主一起使用的适当的克隆和表达载体,所述参考文献的相关公开内容在此以引用方式并入。关于蛋白质生产方法的另外信息可以例如在美国专利公开号2008/0187954、美国专利号6,413,746和6,660,501以及国际专利公开号W0 04009823中找到,所述专利各自在此以引用方式整体并入。

[0295] 可以根据任何合适的方法纯化由转化宿主产生的蛋白质。此类标准方法包括色谱法(例如离子交换、亲和及尺寸柱色谱法)、梯度、离心、差异溶解度或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术。亲和标签如六组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感外壳序列和谷胱甘肽-S-转移酶可以附着到蛋白质,以允许通过经过适当的亲和柱的纯化。分离的蛋白质也可以使用此类技术如蛋白酶解、核磁共振和X射线晶体学进行物理表征。

[0296] 在本发明的某些实施方案中,携带至少一种整合或非整合载体的细胞可以通过在表达载体中包括报道基因在体外进行鉴定。一般地,可选择的报道分子是赋予允许选择的性质的报道分子。阳性可选择报道分子是其中报道基因的存在允许其选择的报道分子,而阴性可选择报道分子是其中其存在阻止其选择的报道分子。阳性可选择标记物的一个实例是药物抗性标记物(赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、博来霉素(zeocin)和组胺醇的抗性的基因)。其它类型的报道分子包括可筛选的报道分子,如GFP。

[0297] 用于确定蛋白质(例如重组蛋白)的水平和活性的各种测定是可用的,例如扩增/表达方法、免疫组织化学方法、FISH和脱落抗原测定、DNA印迹、蛋白质印迹或PCR技术。此外,蛋白质表达或扩增可以使用体内诊断测定进行评估,例如通过施用结合待检测蛋白质并用可检测标记(例如放射性同位素)加上标签的分子(例如抗体),并从外部扫描患者用于定位所述标记。因此,测量细胞中的蛋白质水平的水平的方法是本领域一般已知的,并且可以用于评价与本文提供的方法和组合物结合的蛋白质水平和/或活性(适用时)。这些测定可以用于确定修饰对由转基因编码的重组蛋白的效应。例如,这些测定可以用于确定修饰是否导致不能产生正常水平或全功能基因产物的转基因、或者确认包含全部或部分重组蛋白的突变的转基因。

[0298] 在配制时,用于肠胃外施用的水溶液将以与剂量制剂相容的方式并以如在治疗或预防上有效的此类量施用。需要时,溶液可以适当地进行缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖致使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液尤其适合于血管内施用。在这方面,根据本公开内容,本领域技术人员将知道可以采用的无菌水性介质。

[0299] 本文所述组合物的细胞、线粒体或另外活性剂的适当剂量取决于:待治疗的疾病、病理状况或病症的类型;疾病、病理状况或病症的严重程度和过程;疾病、病理状况或病症对先前疗法的响应性;受试者的临床病史;等等。该组合物可以施用一次或在持续数天至数月的一系列治疗中施用,或者直至实现治愈或达到疾病、病理状况或病症的状态的减轻。

[0300] 根据本发明某些方面的干细胞可以使用确定的、不依赖饲养者的培养系统,如TeSR培养基(Ludwig等人,Nat.Biotechnol.2006,24(2):185-7和Ludwig等人,Nat.Methods 2006,3(8):637-46)进行培养且维持在基本上未分化的状态。不依赖饲养者的培养系统和培养基可以用于培养干细胞。这些方法允许干细胞以基本上未分化的状态生长,而不需要小鼠成纤维细胞“饲养层”。

[0301] 根据本发明的某些方面的用于培养细胞的细胞培养基可以使用用于培养动物细胞的培养基作为其基础培养基来制备,所述培养基例如TeSR、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、Improved MEM Zinc Option、IMDM、Medium 199、Eagle MEM、 α MEM、DMEM、Ham、RPMI 1640和Fischer培养基中的任一种及其任何组合,但并不对培养基进行特别限定,只要其可以用于培养动物细胞。特别地,培养基可以是无异源成分的(xeno-free)或化学成分确定的。

[0302] 细胞培养基可以是含血清或无血清培养基。无血清培养基是指不含未加工或未纯化血清的培养基,并且相应地可以包括具有纯化的血液衍生组分或动物组织衍生组分(例如生长因子)的培养基。从预防由异质动物衍生组分污染的方面来看,血清可以衍生自与干细胞相同的动物。

[0303] 细胞培养基可以含有或可以不含血清的任何替代物。血清的替代物可以包括这样的材料,其适当地含有白蛋白(如富含脂质的白蛋白、白蛋白替代品如重组白蛋白、植物淀粉、右旋糖酐和蛋白质水解物)、转铁蛋白(或其它铁转运蛋白)、脂肪酸、胰岛素、胶原前体、微量元素、2-巯基乙醇、3'-硫醇甘油、人血浆裂解物或其等价物。例如,血清的替代物可以通过国际公开号98/30679中公开的方法进行制备。可替代地,为了方便起见,可以使用任何商购可得的材料。商购可得的材料包括敲除血清替代物(KSR)、化学成分确定的脂质浓缩物(Gibco)和Glutamax(Gibco)。

[0304] 细胞培养基还可以含有脂肪酸或脂质、葡萄糖、氨基酸(如非必需氨基酸)、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化物质、2-巯基乙醇、丙酮酸、缓冲剂 and 无机盐。2-巯基乙醇的浓度例如可以为约0.05至1.0mM,且特别为约0.1至0.5mM,但并不对该浓度进行特别限定,只要其适合于培养干细胞。

[0305] 根据本发明某些方面的用于培养细胞的培养容器可以包括但不特别限于:烧瓶、组织培养瓶、皿、培养皿、组织培养皿、多皿(multi dish)、微板、微孔板、多板(multi plate)、多孔板、微载玻片、腔室载玻片、管、托盘、CellSTACK®、腔室、培养袋和滚瓶,只要它能够在其中培养干细胞。细胞可以以至少或约0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500ml或其中可推导出的任何范围的体积进行培养,取决于培养物的需要。在某个实施方案中,培养容器可以是生物反应器,其可以指支持生物活性环境的任何装置或系统。生物反应器可具有至少或约2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500升,1、2、4、6、8、10、15立方米或其中可推导出的任何范围的体积。

[0306] 培养容器可以是细胞粘附的或非粘附的,并根据目的进行选择。细胞粘附培养容器可以涂布有用于细胞粘附的任何基材,例如细胞外基质(ECM),以改善容器表面对细胞的粘附性。用于细胞粘附的基材可以是预期附着细胞的任何材料。用于细胞粘附的基材包括胶原、明胶、聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、层粘连蛋白和纤连蛋白、其片段或混合物。

[0307] 根据本发明某些方面的细胞也可以通过以下进行培养:悬浮培养包括在载体上的悬浮培养(Fernandes等人,Nature Cell Biology,2004;6:1082-93)或凝胶/生物聚合物封装(美国公开2007/0116680)。术语细胞的悬浮培养意指细胞在培养基中相对于培养容器或饲养细胞(如果使用的话)在非粘附条件下培养。

[0308] 本文所述的各种方法可以与本发明一起使用,以使干细胞分化成细胞或细胞谱

系,包括但不限于角质形成细胞、造血细胞、肌细胞、成纤维细胞、上皮细胞和表皮细胞,以及由其衍生的组织或器官。

实施例

[0309] 应理解,本文所公开的实施例和实施方案仅用于说明性目的,并且根据其的各种修改或改变将由本领域技术人员想到并且将被包括在本申请的精神和范围内。

[0310] 实施例1

[0311] 用猪线粒体处理细胞改善在急性和慢性冷暴露后的耗氧率

[0312] 为了分离猪线粒体,从新鲜切除的猪心中取出整个左心室,并置于冰冷的洗涤介质(300mM蔗糖、1mM EGTA、10mM HEPES (pH 7.4))中用于运输。从左心室切下一片1平方英寸的组织并转移到预冷的50ml锥形管中,所述锥形管含有20mL冰冷的海藻糖缓冲液。将组织样品切碎以获得大小为大约1-2mm的样品片。将样品在冰上的枯草杆菌蛋白酶A溶液(在250 μ l海藻糖缓冲液中的5mg/ml枯草杆菌蛋白酶A)中酶促消化10分钟,并使用Potter-Elvehjem模式组织匀浆器进行匀浆(3-7次通过)。然后使样品通过纱布进入50ml锥形管内。将样品离心(在4°C下以500g 10分钟),并将上清液倒入新的50mL锥形管中。将样品在4°C下以15,000g离心10分钟。弃去上清液。将样品团块重悬浮于500 μ l海藻糖缓冲液中并转移到1.5ml Eppendorf管中。然后用500 μ l海藻糖缓冲液冲洗50ml锥形管,将其添加到1.5ml Eppendorf管中的样品中。通过离心(在4°C下以15,000g离心10分钟)将样品团块洗涤3次,并重悬浮于1mL海藻糖缓冲液中。

[0313] 先前已显示,其为线粒体呼吸的指标的耗氧率(OCR)可以使用Seahorse Extracellular Flux (XF) Analyzer (Seahorse Bioscience, Inc., North Billerica, MA), 使用Seahorse测定在活细胞中进行实时确定。参见Rose, S.等人, PLOS One (2014), 9 (1): e85436 (“Rose等人”), 其以引用方式整体并入本文。Rose等人显示了线粒体呼吸的多重测量,如基础呼吸、ATP关联呼吸、质子泄漏呼吸和储备能力,可以通过用特定抑制剂处理细胞来获得。同上。特别地,可以用寡霉素(其为复合物V的抑制剂)处理细胞,以获得ATP关联呼吸和质子泄漏呼吸。其为质子载体的羰基氰对三氟甲氧基苯腙(FCCP),破坏线粒体内膜梯度并促使电子传递链(ETC)以其最大速率发挥功能。同上。因此,最大呼吸能力可以通过用FCCP处理细胞来确定。同上。非线粒体呼吸可以通过用鱼藤酮(其为复合物I的抑制剂)和抗霉素A(其为复合物III的抑制剂)的组合处理来确定,所述组合处理有效关闭ETC功能。

[0314] 通过Seahorse测定确定了用分离的猪线粒体处理人肺动脉内皮细胞(HPAEC)对急性冷暴露后的耗氧率(OCR)的作用。将HPAEC在4°C下放置6小时。在20 μ L线粒体悬浮液(含有29个颗粒/细胞的呼吸缓冲液;“+MITO”)或仅20 μ L呼吸缓冲液(“-MITO”)的存在下,HPAEC在37°C下在常氧下恢复1小时,并在非CO₂培养箱中平衡10分钟。然后使用Seahorse仪,用10 μ M寡霉素、20 μ M FCCP和5 μ M鱼藤酮/抗霉素A (Rot/AA) 执行“线粒体应激测试”。如图1中所示,与相应的基线、寡霉素处理的、FCCP处理的或Rot/AA处理的“-MITO”HPAEC对照相比,猪线粒体处理增加了在基线时(43.6%增加)、寡霉素处理的HPAEC (204.9%增加)、FCCP处理的HPAEC (8.4%增加)和Rot/AA处理的HPAEC (34.1%增加)的OCR。

[0315] 还检查了HPAEC的猪线粒体处理对慢性冷暴露后的OCR的作用。将HPAEC在4°C下放置12小时。在20 μ L线粒体悬浮液(含有172个颗粒/细胞的呼吸缓冲液;“+MITO”)或仅20 μ L呼

吸缓冲液 (“-MITO”) 的存在下,HPAEC在37℃下在常氧下恢复1小时,并在非CO₂培养箱中平衡50分钟。使HPAEC在37℃下在非CO₂条件下的Seahorse仪中静置。然后使用Seahorse仪,用10uM寡霉素、20uM FCCP和5uM鱼藤酮/抗霉素A (Rot/AA) 执行“线粒体应激测试”。如图2中所示,与相应的基线、寡霉素处理的、FCCP处理的或Rot/AA处理的“-MITO”HPAEC对照相比,猪线粒体处理增加了在基线时(32.4%增加)、寡霉素处理的HPAEC(51.9%增加)、FCCP处理的HPAEC(9.5%增加)和Rot/AA处理的HPAEC(45.2%增加)的OCR。

[0316] 使用对于猪线粒体(猪(*Sus scrofa*))ND5(MtND5)特异性的探针,来评估通过暴露于冷应激的HPAEC的猪线粒体摄取。特别地,评估了猪线粒体处理在冷应激和冷恢复期间的效应。将猪线粒体施用于经历冷应激的HPAEC。对于冷恢复组,HPAEC在常温下培养24小时,然后在猪线粒体处理之前在4℃下培养24小时。在猪线粒体处理后,在收获前,使冷恢复的HPAEC在恢复条件(在37℃下的常温)下温育24小时、48小时或72小时。对于冷暴露组,细胞在常温下培养48小时,用猪线粒体处理,并立即置于4℃下。在冷暴露24、48或72小时后,收获冷暴露的HPAEC。对于每个样品生成cDNA,并使用引物/探针混合物来检测与参考基因PPIA相比,猪MtND5的表达水平(正向引物序列CAGCACTATGTGCAATCACACAAAA;反向引物序列TGGTTGATGCCGATTGTCCTATT;报道序列TCGTAGCCTTCTCAACTTC;上下文序列CAGCACTATGTGCAATCACACAAAA)。如图3中所示,在冷应激下的HPAEC以剂量依赖性方式吸收猪线粒体,并且猪MtND5的最大表达在1,666个颗粒/细胞时达到。在冷恢复条件下,猪MtND5的最大表达在24小时达到,其中与未处理的冷恢复对照相比,观察到猪MtND5的26,201%增加。在冷暴露条件下,猪MtND5的最大表达在72小时达到,其中与未处理的冷暴露对照相比,观察到MtND5的301,932%增加。

[0317] 如图4中所示,在暴露于冷应激的HPAEC中的人线粒体DNA的转录在很大程度上不受猪线粒体处理的影响。将HPAEC处理,在冷恢复或冷暴露条件下培养,并在24小时、48小时或72小时的时间点收获,如上所述。如使用对于人MtND5特异性的探针确定的,与常温对照相比,在冷恢复条件下的未处理的对照HPAEC证实了人MtND5表达的55%增加。这种增加通过猪线粒体处理得到缓和,其中1个颗粒/细胞证实了与未处理的常温HPAEC相比3.8%的表达减少,且与未处理的冷恢复对照相比33%的表达减少。在冷暴露组中,人MtND5的最大表达在72小时达到,但这种增加不受猪线粒体处理的显著影响。

[0318] 总之,这些发现显示了,暴露于冷应激的人内皮细胞吸收猪线粒体,其增加了冷损伤后的细胞耗氧率,并且不影响人线粒体RNA的转录。与寡霉素处理的“-MITO”HPAEC对照相比,猪线粒体处理增加了在急性和慢性冷暴露后,寡霉素处理的HPAEC中的OCR(图1和2)。这些数据指示了,线粒体处理增加了质子泄漏呼吸(即,其中质子迁移到基质内而不产生ATP的过程)。研究提示,质子泄漏呼吸降低了线粒体活性氧(ROS)的产生,并且这种泄漏或解偶联保护免于各种疾病中的ROS。参见例如,Ganote,C.E.和S.C.Armstrong,J Mol Cell Cardiol.2003,35(7):749-59;Speakman,J.R.等人,Aging Cell.2004,3(3):87-95;和Green,K.等人,Diabetes.2004,53(增刊1):S110-8。因此,猪线粒体处理可以保护免于各种疾病例如糖尿病和心血管疾病中的ROS。

[0319] 实施例2

[0320] 在冷恢复和冷暴露期间用猪线粒体处理细胞改变了与炎症、先天性免疫应答和细胞应激相关的基因的表达

[0321] NF- κ B是一种已知上调促炎基因表达的转录因子。通过qRT-PCR评估在冷暴露和冷恢复条件下猪线粒体处理对HPAEC中的NF- κ B基因表达的作用。如图5中所示,HPAEC的猪线粒体处理减少了在24小时的冷恢复中的NF- κ B表达。将HPAEC处理,在冷恢复或冷暴露条件下培养,并在24小时、48小时或72小时的时间点收获,如上文对于图3所述的。在冷恢复条件下,与常温对照相比,未处理的对照HPAEC证实了在24小时NF- κ B表达的83%增加。与未处理的冷恢复对照HPAEC相比,猪线粒体处理趋于降低NF- κ B表达,其中与未处理的冷恢复对照HPAEC相比,1个颗粒/细胞证实了22%降低。在冷暴露条件下,NF- κ B表达的轻微增加在用猪线粒体处理的HPAEC中在24小时发生,但这种增加并非统计学显著的。这些数据提示,人内皮细胞的猪线粒体处理减少了与从冷暴露恢复相关的促炎应答。

[0322] Toll样受体9 (TLR-9) 在识别胞质线粒体DNA (mtDNA) 后激活先天性免疫应答,其为细胞损害的征兆。如图6中所示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在24小时后的冷恢复中的TLR-9表达。将HPAEC处理,在冷恢复或冷暴露条件下培养,并在24小时、48小时或72小时的时间点收获,如上文对于图3所述的。在冷恢复条件下,与常温对照相比,未处理的对照HPAEC证实了在24小时TLR-9表达的101%增加。与未处理的冷恢复对照HPAEC相比,猪线粒体处理趋于降低TLR-9表达,其中与未处理的冷恢复对照HPAEC相比,166个颗粒/细胞证实了37%降低。在冷暴露条件下,TLR-9的最大表达在用1个颗粒/细胞处理的HPAEC中发生,其中与未处理的冷暴露对照HPAEC相比,观察到TLR-9表达的60%增加。这些数据提示,在冷恢复期间,人内皮细胞的猪线粒体处理减少了与来自冷暴露的细胞损害相关的先天性免疫应答。

[0323] 血红素加氧酶-1 (HO-1) 的上调减少了炎症和组织损害,并在细胞应激期间是冷冻保护性的。如图7中所示,HPAEC的猪线粒体处理影响了HO-1的表达。将HPAEC处理,在冷恢复或冷暴露条件下培养,并在24小时、48小时或72小时的时间点收获,如上文对于图3所述的。猪线粒体处理增加了在冷暴露条件下的HO-1表达。猪线粒体处理在16个颗粒/细胞时最有效,其中与未处理的冷暴露对照HPAEC相比,可见HO-1表达的24%增加(与未处理的常温对照HPAEC相比242%的增加)。这些数据提示,人内皮细胞的猪线粒体处理通过增加HO-1表达来减少在冷暴露期间的炎症和细胞损害。

[0324] 实施例3

[0325] 在缺氧条件下用猪线粒体处理细胞降低了促炎基因产物的分泌

[0326] 为了评估在缺氧条件下的猪线粒体处理对人内皮细胞的作用,在猪线粒体处理之前,HPAEC在常氧或缺氧(1%O₂)下培养24小时。在猪线粒体处理后,将HPAEC放回其分别的条件下,常氧或缺氧。然后在24小时、48小时或72小时收集300 μ L细胞培养基,并在适当的时间点(24小时、48小时或72小时)置于无菌的1.5mL Eppendorf管中。将管在4℃下以2,000rpm向下旋转10分钟。收集上清液(270 μ L)并置于新鲜、无菌的1.5mL Eppendorf管中。这些样品立即储存在-80℃下,直到通过炎症细胞因子阵列分析时。使用炎症细胞因子阵列(RayBiotech;Norcross,GA)在细胞培养基中测量分泌的促炎基因产物。仅培养基对照用于背景校正。

[0327] 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),也称为集落刺激因子-1(CSF-1),促进愈合,但也促进具有M1表型的巨噬细胞。在缺血/移植模型中,M-CSF血清水平在移植器官的急性排斥过程中激增。如图8中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低

了在缺氧条件下的M-CSF分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,M-CSF分泌在48小时减少了65%。

[0328] 巨噬细胞炎症蛋白1 β (MIP-1 β),也称为趋化因子(C-C基序)配体4(CCL4),对于针对感染和炎症的免疫应答是关键的。MIP-1 β 激活免疫细胞,导致急性炎症,并且可以诱导促炎细胞因子如IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的合成和释放。如图9中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的MIP-1 β 分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效地减少MIP-1 β 分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,MIP-1 β 分泌在48小时减少了73%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。

[0329] 血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)是促炎细胞因子产生的有力诱导剂并刺激细胞增殖。如图10中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的PDGF-BB分泌。猪线粒体处理在36个颗粒/细胞时最有效地减少PDGF-BB分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,PDGF-BB分泌在48小时减少了69%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。

[0330] RANTES,也称为趋化因子(C-C基序)配体5(CCL5),是一种由NF- κ B途径上调的促炎趋化因子。RANTES在将白细胞募集到炎症部位方面发挥积极作用。如图11中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的RANTES分泌。猪线粒体处理在0.3个颗粒/细胞时最有效地减少RANTES分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,RANTES分泌在48小时减少了59%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。

[0331] 在炎症状态下,细胞内粘附分子-1(ICAM-1)是上调的,以允许免疫细胞通过损伤部位。ICAM-1表达维持促炎环境,以允许免疫细胞的迁移。如图12中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的ICAM-1分泌。猪线粒体处理在0.3个颗粒/细胞时最有效地减少ICAM-1分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,ICAM-1分泌在48小时减少了82%。在3,687个颗粒/细胞时可见效力降低。

[0332] 已知脑源性神经营养因子(BDNF)在缺氧暴露后由HPAEC分泌,并且可能在PAH发病机制中发挥作用。如图13中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的BDNF分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效地减少BDNF分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,BDNF分泌在48小时减少了85%。

[0333] 白细胞介素-1 β (IL-1 β)是一种牵涉炎症的促炎细胞因子。IL-1 β 的表达受炎症小体的调控。如图14中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的IL-1 β 分泌。猪线粒体处理在368个颗粒/细胞时最有效地减少IL-1 β 分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,IL-1 β 分泌在48小时减少了70%。

[0334] 生长/分化因子15(GDF15)是TGF- β 超家族的成员。在肺中,GDF15的过表达导致过度的免疫应答,而GDF15表达的压制减弱炎症应答。如图15中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的GDF15分泌。猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时最有效地减少GDF15分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,GDF15分泌在48小时减少了70%。

[0335] 白细胞介素6(IL-6)是一种响应组织损害而产生的多效性细胞因子。IL-6在炎症和免疫细胞激活中发挥作用。如图16中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的IL-6分泌。猪线粒体处理在368个颗粒/细胞时最有效

地减少IL-6分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,IL-6分泌在48小时减少了70%。

[0336] 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 是一种具有有力的调控和炎症活性的多效性细胞因子。在IL-6的存在下,已知TGF- β 1驱动T辅助17 (Th17) 细胞的分化,其促进炎症环境。如图17中所示,通过促炎细胞因子阵列的测定显示,HPAEC的猪线粒体处理降低了在缺氧条件下的转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 分泌。猪线粒体处理在36个颗粒/细胞时最有效地减少TGF- β 1分泌,其中与未处理的缺氧对照HPAEC相比,TGF- β 1分泌在48小时减少了95%。

[0337] 使用对于猪MtND5特异性的探针,来评估通过暴露于缺氧应激的HPAEC的猪线粒体摄取。特别地,评估了猪线粒体处理在缺氧暴露和缺氧恢复期间的效应。将猪线粒体施用于经历缺氧应激的HPAEC。对于缺氧恢复组,HPAEC在常氧下培养24小时,然后在猪线粒体处理之前在缺氧(1%O₂) 下培养24小时。在猪线粒体处理后,在收获前,将缺氧恢复的HPAEC放回常氧下24小时、48小时或72小时。对于缺氧暴露组,HPAEC在常氧下培养48小时,用猪线粒体处理,并立即置于缺氧(1%O₂) 下。在缺氧暴露24、28或72小时后,收获缺氧暴露的HPAEC。如使用对于猪MtND5特异性的探针确定的且如图18中所示的,在缺氧应激下的HPAEC以剂量依赖性方式吸收猪线粒体,并且猪MtND5的最大表达在1,666个颗粒/细胞时达到。在缺氧恢复条件下,猪MtND5的最大表达在48小时达到,其中与未处理的缺氧恢复对照相比,观察到猪mtND5的4,655%增加。在缺氧暴露条件下,最大表达在24小时达到,其中与未处理的缺氧暴露对照相比,观察到猪mtND5的26,680%增加。

[0338] 如图19中所示,在暴露于缺氧应激的HPAEC中的人线粒体DNA的转录在很大程度上不受猪线粒体处理的影响。将HPAEC处理,在缺氧恢复或缺氧暴露条件下培养,并在34小时、48小时或72小时的时间点收获,如上文对于图18所述的。如使用对于人MtND5特异性的探针确定的,对于缺氧恢复组和缺氧暴露组两者,人MtND5的最大表达均在72小时发生。看起来受猪线粒体处理影响的时间点在24小时出现。在缺氧恢复组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的人MtND5表达降低的趋势,其中与未处理的缺氧对照相比,1个颗粒/细胞证实存在24小时33%的表达减少。在缺氧暴露组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的人MtND5表达增加的趋势,其中与未处理的缺氧暴露细胞相比,1,666个颗粒/细胞导致在24小时36%的增加。

[0339] 总之,这些结果显示,暴露于缺氧条件的人内皮细胞的处理吸收猪线粒体,其降低广泛多样的促炎基因产物的分泌,并且不影响人线粒体RNA的转录。这些结果提示,猪线粒体处理是减少在器官或组织移植过程中,以及在细胞、组织和器官的冷储存或运输过程中,与缺氧相关的炎症和细胞损害的有效手段。

[0340] 实施例4

[0341] 用猪线粒体处理细胞改变了在缺氧条件下的基因表达

[0342] 为了评估猪处理对缺氧条件下的基因表达的作用,将猪线粒体施用于经历缺氧应激的HPAEC。对于缺氧恢复组,HPAEC在常氧下培养24小时,然后在猪线粒体处理之前在缺氧(1%O₂) 下培养24小时。在猪线粒体处理后,在收获前,将缺氧恢复的HPAEC放回常氧下24小时、48小时或72小时。对于缺氧暴露组,HPAEC在常氧下培养48小时,用猪线粒体处理,并立即置于缺氧(1%O₂) 下。在缺氧暴露24、28或72小时后,收获缺氧暴露的HPAEC。通过qRT-PCR评估基因表达。

[0343] 如上文讨论的,toll样受体9 (TLR-9) 在识别溶质mtDNA时激活先天性免疫应答,其

为细胞损害的征兆。HPAEC的猪线粒体处理减少了在缺氧恢复中的TLR-9表达,但增加了在24小时的缺氧暴露中的TLR-9表达,如图20中所示。在缺氧恢复组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的TLR-9表达降低的趋势,其中与未处理的缺氧对照相比,1个颗粒/细胞证实处理后24小时38%的表达减少。在缺氧暴露组中,存在关于用猪线粒体处理的HPAEC中的TLR9表达增加的趋势,其中与未处理的缺氧暴露细胞相比,1,666个颗粒/细胞导致在处理24小时32%的增加。这些数据提示,人内皮细胞的猪线粒体处理减少了与缺氧恢复期间的细胞损害相关的先天性免疫应答。

[0344] 白细胞介素8 (IL-8; CXCL8) 吸引并激活炎症区域中的嗜中性粒细胞。IL-8的升高是移植失败和其它病理后果的指标。如上文讨论的, IL-6是一种响应组织损害而产生,并且在炎症和免疫细胞激活中发挥作用的多效性细胞因子。如图21中所示,经历缺氧应激的HPAEC的猪线粒体处理减少了IL-8和IL-6的mRNA表达。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在3,687个颗粒/细胞时对于减少IL-8表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见IL-8表达的58%降低(图21A)。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时对于减少IL-6表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见IL-6表达的30%降低(图21B)。这些数据提示,人内皮细胞的猪线粒体处理减少了与经历缺氧应激和组织损害的细胞相关的炎性细胞因子应答。

[0345] BH3相互作用域死亡激动剂(BID)是一种促凋亡蛋白,其在响应细胞凋亡信号传导破坏线粒体外膜中发挥作用。如图21中所示,经历缺氧应激的HPAEC的猪线粒体处理减少了BID的mRNA表达。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在36个颗粒/细胞时对于减少BID表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见BID表达的30%降低(图21C)。这些数据提示,人内皮细胞的猪线粒体处理减少了与通过缺氧应激诱导的细胞凋亡相关的线粒体膜破坏。

[0346] 线粒体ND1 (MtND1) 是涉及呼吸复合物1的基因,所述呼吸复合物1是线粒体氧化磷酸化的电子传递链中的第一步。线粒体细胞色素B (MtCyB) 是唯一线粒体编码的呼吸复合物III亚基。如图21中所示,经历缺氧应激的HPAEC的猪线粒体处理减少了MtND1和MtCyB的mRNA表达。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在3个颗粒/细胞时对于减少人MtND1表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见MtND1表达的57%降低(图21D)。缺氧HPAEC的猪线粒体处理在0.3个颗粒/细胞时对于减少人MtCyB表达最有效,其中与未处理的缺氧对照相比,可见MtCyB表达的57%降低(图21E)。

[0347] 24小时缺氧暴露减少宿主细胞线粒体活性,并因此产生增加线粒体基因表达的补偿性应激应答(例如增加的ND1和CyB表达)。猪线粒体移植保护宿主细胞免受缺氧应激,消除了关于遗传补偿的需要。还发现用猪线粒体处理人内皮细胞降低了缺氧诱导的细胞增殖,如通过线粒体处理的HPAEC的总细胞蛋白含量降低所指示的(图22)。异常的内皮细胞增殖牵涉肺高血压疾病(包括肺动脉高压)的发病机制。参见例如, Sakao, S. 等人, *Respir Res.* 2009; 10 (1) : 95。因此,这些数据提示,用猪线粒体在体内或离体处理患者的细胞可以治疗肺疾病或缓解与肺疾病相关的症状。

[0348] 实施例5

[0349] 用猪线粒体处理上皮细胞改善了核酸含量

[0350] 人肺泡上皮II型(AT2)细胞具有从低温储存中出来的低活力,并且无法良好地粘附至细胞培养板。为了确定猪线粒体处理是否改善人肺上皮细胞在冷冻保存后的细胞活力

和粘附性,伴随和不伴随猪线粒体,将AT2细胞直接从冷冻储存中接种,并在标准培养箱中温育过夜。在过夜温育之后,与未处理的AT2细胞对照相比,用猪线粒体处理的AT2细胞的核酸含量增加了23%(图23)。这些数据显示,猪线粒体处理改善了人肺上皮细胞在冷冻保存后的细胞活力、粘附或生长。因此,猪线粒体处理可以作为细胞疗法的部分来实施,以改善肺或肺细胞的储存、活力或功能性。

[0351] 实施例6

[0352] 猪线粒体的稳定性和功能性在冷储存之后得到保留

[0353] 两种猪线粒体分离物(“实验1”和“实验2”)用于在Seahorse仪中测试线粒体活性。在含有ADP的呼吸缓冲液中产生一系列线粒体稀释物。将50 μ L的每种线粒体悬浮液装载到8孔Seahorse细胞培养板的六个孔内。将板在4 $^{\circ}$ C下以2000xg离心20分钟。在离心后,将200 μ L含有ADP的呼吸缓冲液(RB)添加到每个孔中,并且将板在非CO₂培养箱中平衡10分钟。用Seahorse仪记录基线耗氧量。图24显示了以各种浓度的分离的猪线粒体在含有二磷酸腺苷(ADP)的呼吸缓冲液中的线粒体活性。观察到在 $\sim 7e^9$ 个颗粒(使用Zetaview来计数颗粒)时OCR的“最大化”。

[0354] 为了确定猪线粒体在冷储存后是否保留线粒体活性,将猪线粒体的三个200 μ L等分试样以15,000xg离心10分钟。去除上清液,并且将两个团块重悬浮于200 μ L含有ADP的呼吸缓冲液(RB)中。将一个团块重悬浮于200 μ L海藻糖(TH)储存缓冲液中。一个RB团块在4 $^{\circ}$ C下储存过夜,并且剩余的RB和TH团块在-80 $^{\circ}$ C下储存。在冷储存后大约22小时,将管在冰上解冻,并使用呼吸缓冲液执行1:10稀释。1:10稀释也用于前一天获取的新鲜解冻的线粒体的对照组(即,图24的“实验2”的猪线粒体)。将50 μ L的线粒体悬浮液装载到8孔Seahorse细胞培养板的六个孔内。将板在4 $^{\circ}$ C下以2000xg离心20分钟。在离心后,将200 μ L呼吸缓冲液添加到每个孔中,并且将板在非CO₂培养箱中平衡10分钟。用Seahorse仪记录基线耗氧量。如图25中所示,猪线粒体在-80 $^{\circ}$ C下的冷储存后保留线粒体活性。虽然线粒体活性在4 $^{\circ}$ C下随着时间过去降低,但在-80 $^{\circ}$ C下的储存导致大约40%OCR(线粒体活性)的保留。在海藻糖中的储存改善了OCR,导致原始OCR率的大约60%保留。

[0355] 实施例7

[0356] 猪线粒体处理改善了在EVLP期间的肺功能

[0357] 为了制备用于离体肺灌注(EVLP)的肺,使猪肺膨胀,并且将气管夹住。在程序启动之前,将肺在冰冷的盐水中储存大约1小时。肺动脉(PA)和主支气管(气管)在室温下进行插管。左心房(LA)保持开放,以允许灌注液从肺自由流出。在4小时的EVLP期间,对肺进行通气并用37 $^{\circ}$ C的Steen溶液进行灌注,所述Steen溶液用碳酸氢盐进行缓冲,并用5%CO₂、95%N₂进行脱氧。使用压力控制的通气,其中气道压力上限为17cmH₂O。PA灌注以100ml/min开始,并在大约30-45分钟内增加到300ml/min。在EVLP期间,灌注保持在300ml/min下。在线粒体注射之前,通过在100%的FiO₂下测量PA和LA PO₂来评价气体交换。此时还记录了生理参数,例如动态顺应性。然后将线粒体或呼吸缓冲液(对照)注射到PA线内,并停止灌注10分钟以允许线粒体摄取到肺内。重新开始灌注,并且在注射后15分钟、1小时、2小时和4小时进行EVLP评价,包括气体交换。

[0358] 如图26中所示,在处于EVLP时,猪线粒体处理改善了分离的猪尸体肺的功能。与右肺对照相比,注射到左肺内的分离的猪线粒体增加了下肺(图26A)、上肺(图26B)和中肺(图

26C) 中的增殖细胞核抗原 (PCNA) 阳性细胞, 如通过组织学测量的 (图26A)。猪线粒体处理在24小时在下肺中最有效 (图26A), 其中与对照 (箭头) 相比, 在猪线粒体处理的细胞中可见50%的改善。如图31中进一步所示, 与用呼吸缓冲液注射的猪尸体肺 (“对照”) 相比, 将分离的猪线粒体注射到处于EVLP的猪尸体肺内 (“+MITO”) 降低了凋亡细胞的百分比 (%TUNEL; 图31A), 并增加了细胞粘附分子CD31的表达 (图31B)。凋亡细胞的百分比通过TUNEL测定对EVLP期间取自猪尸体肺的组织活组织检查进行确定。CD31表达通过用抗CD31抗体免疫荧光染色组织活组织检查进行确定。

[0359] 如图27中所示, 在处于EVLP时, 猪线粒体处理改善了分离的猪尸体肺的潮气量 (图27A) 和动态压缩 (图27B) 参数。将分离的猪线粒体注射到处于EVLP的分离的猪尸体肺内, 并在肺继续膨胀的同时将灌注关闭10分钟。在注射后10分钟、注射后1小时和注射后4小时, 确定潮气量 (ml/kg) 和动态压缩 (TV/(PIP-PEEP)) (TV=潮气量; PIP=吸气峰压; PEEP=呼气末正压)。基线潮气量和动态压缩分别代表注射前的潮气量和动态压缩。与基线相比, 在注射后10分钟可见潮气量的30%改善和动态压缩的40%增加。如图29中进一步所示, 与用呼吸缓冲液注射的处于EVLP的猪尸体肺相比, 将分离的猪线粒体注射到处于EVLP的猪尸体肺内增加了潮气量 (mL/kg; 图29A) 和气体交换 ($\Delta PO_2/FiO_2$; 图29B)。

[0360] 图28显示, 在分离的猪线粒体注射到处于EVLP的分离的猪尸体肺内之后, 存在培养基葡萄糖的立即和进行性下降、以及在注射后一小时循环铵的17%降低。在EVLP开始后24分钟, 处于EVLP的分离的猪尸体肺用分离的猪线粒体进行注射, 并在EVLP下维持大约20小时。使用BioPat (Sartorius, Bohemia, NY) (图28A) 和Nova (Nova Biomedical, Waltham, MA) (图28B) 定量循环培养基中的葡萄糖 (g/L), 并且使用Nova (图28C) 定量循环铵 (NH_4^+ ; mmol/L)。初始Nova葡萄糖和铵水平代表在EVLP之后的时间0的Nova葡萄糖和铵水平。基线Nova葡萄糖和铵水平代表紧在猪线粒体注射之前的Nova葡萄糖和铵水平。如图30中进一步所示, 与用呼吸缓冲液注射的处于EVLP的猪尸体肺相比, 将分离的猪线粒体注射到处于EVLP的猪尸体肺内 (“+MITO”) 降低了循环乳酸盐的量 (mg/ml; 图30A), 导致葡萄糖/乳酸盐比增加 (图30B)。

[0361] 与呼吸缓冲液对照相比, 线粒体注射增加了在EVLP期间的潮气量和气体交换 (图29)。线粒体注射降低了在EVLP期间的循环乳酸盐, 导致葡萄糖/乳酸盐比增加 (图30)。最后, 在EVLP期间获取的组织活组织检查揭示, 在EVLP期间, TUNEL染色 (凋亡细胞) 的降低以及CD31 (细胞粘附的标记物) 的增加 (图31)。

[0362] 总之, 在EVLP期间用分离的猪线粒体处理的肺显示了改善的细胞功能 (例如增加的细胞活力、粘附和生长)、改善的肺功能 (例如改善的潮气量、动态压缩和气体交换) 和改善的代谢活性 (例如增加的葡萄糖/乳酸盐比)。因此, 可以在EVLP期间实施猪线粒体处理, 以改善肺活力和功能。

[0363] 实施例8

[0364] 分离的猪线粒体的健康和功能的快速评价

[0365] 受损线粒体的表型特性 (例如肿胀、mPTP开口失调、呼吸减少、膜电位减少和完全通透性) 用于快速评价分离的猪线粒体的健康。特别地, 将产生健康线粒体的分离物的表型特性与物理损害线粒体 (即, 过量热生成、延长暴露于酶) 或从纤维化心脏中分离的线粒体的分离物进行比较。在每种情况下, 线粒体在分析前在-80℃下储存24小时。

[0366] 如图32中所示,通过测量线粒体肿胀、mPTP开口和/或线粒体呼吸,可以快速评价分离的线粒体的健康和功能。使用流式细胞术测量线粒体肿胀。本研究中使用的线粒体在分析前在-80℃下储存24小时。对未染色的线粒体收集多达30,000个事件。评价的参数包括前侧散射面积(FSC-A;大小)和侧散射高度(SSC-H;复杂度)。如果线粒体具有增加的大小和降低的复杂度,则它们被确定为具有肿胀表型。与健康的线粒体相比,受损的线粒体更大且更不复杂(图32A)。

[0367] 使用流式细胞术测量mPTP开口。用4μM钙黄绿素-AM染色线粒体。对线粒体收集多达30,000个事件,用488nm激光激发,并且评价FITC发射。如果线粒体能够保留荧光钙黄绿素,则它们被确定为具有受调控的mPTP,导致FITC+染色。如果线粒体不能保留荧光钙黄绿素,则它们被确定为具有失调的、连续的mPTP开口,导致FITC染色减少。与健康的线粒体相比,受损的线粒体由于其无法保留钙黄绿素AM而具有急剧减少的FITC发射(图32B)。

[0368] 为了评估线粒体呼吸,使用Seahorse仪来确定呼吸控制率(RCR)。RCR由在ADP刺激的呼吸(RCR)和解偶联的呼吸(RCRmax)期间的耗氧率(OCR)进行计算。在这两种状态各自的期间的OCR除以基础OCR,以获得OCR比。通过注射线粒体质子载体解偶联剂BAM15来达到最大呼吸。与健康的线粒体相比,受损的线粒体具有显著减少的ADP刺激的呼吸率和解偶联的呼吸率(图32C)。

[0369] 如图33中所示,通过测量线粒体膜电位和/或线粒体膜通透性,也可以快速评价分离的线粒体的健康和功能。使用JC-1测定通过流式细胞术评价线粒体膜电位的变化。线粒体用2μM JC-1进行染色,收集由488nm激光激发的多达30,000个事件,并且评价FITC和PE发射。JC-1染料在线粒体中显示出电位依赖性积累,其通过从绿色/FITC(~529nm)到红色/PE(~590nm)的荧光发射位移进行指示。膜电位敏感性色移是由于红色荧光J-聚集体的浓度依赖性形成。线粒体去极化通过红色:绿色荧光强度比的降低或PE(红色)通道中的信号强度降低进行指示。与健康的线粒体相比,受损的线粒体具有降低的红色:绿色比和急剧减少的PE发射(图33A)。

[0370] 线粒体的完全通透性通过流式细胞术使用SYTOX绿核酸染剂进行测量,所述染剂易于渗透具有受损膜的线粒体。线粒体用1μM SYTOX进行染色,用488nm激光进行激发,收集多达30,000个事件,并且评价FITC发射。用SYTOX绿染色的受损的线粒体将具有比用SYTOX绿染色的未受损的线粒体更高的FITC信号强度。与健康的线粒体相比,受损的线粒体证实增加的FITC发射(图33B)。

[0371] 总之,这些数据显示,通过测量受损线粒体的表型特性,可以快速评价分离的猪线粒体的健康和功能。

[0372] 实施例9

[0373] 分离的猪线粒体在-80℃下的冷储存后保留线粒体功能

[0374] 文献中报道的关于分离的线粒体的一个中心问题(tenant)是不能以保存功能的方式储存线粒体。为了测试长期储存线粒体的能力,在线粒体中评价特性参数(线粒体肿胀、mPTP开口、呼吸、膜电位和完全通透性),所述线粒体已悬浮于海藻糖缓冲液(300mM海藻糖、10mM HEPES、10mM KCl、1mM EGTA、0.1%无脂肪酸BSA,pH至7.2)中,并在以下两种条件下储存:

[0375] (1) 线粒体储存于4℃下,其被视为不能保存线粒体功能;和

[0376] (2) 线粒体储存于-80℃下,其被视为保存线粒体功能。

[0377] 如图34-38中所示和下文所述,线粒体在-80℃下的冷储存后令人惊讶且出乎意料地保留了线粒体功能,如通过线粒体大小、复杂度、mPTP开口、呼吸和总体形态、以及减少HPAEC中的趋化因子分泌的能力确定的。

[0378] 使用流式细胞术测量线粒体的FSC-A(大小)和SSC-H(复杂度),来评价线粒体肿胀,所述线粒体储存在非保存条件(即在4℃下储存)或保存条件(即在-80℃下储存)下。如果线粒体具有增加的大小和降低的复杂度,则它们被确定为具有肿胀表型。虽然储存在4℃下的线粒体几乎立即展示肿胀表型(即大小增加、复杂度降低),但储存在-80℃下的线粒体在储存期间(长达7个月)自始至终保留了与新鲜分离的线粒体可比较的正常表型(图34A)。

[0379] 使用流式细胞术测量线粒体mPTP开口。用4μM钙黄绿素-AM染色线粒体。对染色的线粒体收集多达30,000个事件,用488nm激光激发,并且评价FITC发射。如果线粒体能够保留荧光钙黄绿素,则它们被确定为具有受调控的mPTP,导致FITC+染色。如果线粒体不能保留荧光钙黄绿素,则它们被确定为具有失调的、连续开口,导致FITC染色减少。虽然储存在4℃(非保存条件)下的线粒体失去了调控其mPTP开口的能力,但储存在-80℃(保存条件)下的线粒体在储存期间(长达7个月)自始至终控制与新鲜分离的线粒体可比较的mPTP开口(图34B)。

[0380] 为了评估在非保存条件或保存条件下储存的线粒体的线粒体呼吸,使用Seahorse仪来确定RCR。RCR由在ADP刺激的RCR和解偶联的呼吸(RCR_{max})期间的OCR进行计算。在这两种状态各自的期间的OCR除以基础OCR,以获得OCR比。通过注射线粒体质子载体解偶联剂BAM15来达到最大呼吸。储存在4℃下的线粒体的ADP刺激的呼吸率和解偶联的呼吸率随着时间过去下降,而储存在-80℃下的线粒体在储存期间(长达6周)自始至终具有与新鲜分离的线粒体可比较的ADP刺激的呼吸率(图34C)和解偶联的呼吸率(图34D)。

[0381] 使用JC-1测定通过流式细胞术评价线粒体的线粒体膜电位的变化,所述线粒体储存在非保存条件(在4℃下储存)或保存条件(在-80℃下储存)下。线粒体用2μM JC-1,2进行染色,收集由488nm激光激发的多达30,000个事件,并且评价FITC和PE发射。JC-1染料在线粒体中显示出电位依赖性积累,其通过从绿色/FITC(~529nm)到红色/PE(~590nm)的荧光发射位移进行指示。膜电位敏感性色移是由于红色荧光J-聚集体的浓度依赖性形成。线粒体去极化通过红色:绿色荧光强度比的降低或PE(红色)通道中的信号强度降低进行指示。虽然储存在4℃下的线粒体显示膜电位的急剧减少,但储存在-80℃下的线粒体在储存期间(长达7个月)自始至终保留了与新鲜分离的线粒体可比较的膜电位(图35A)。

[0382] 在非保存条件或保存条件下储存的线粒体的通透性通过流式细胞术使用SYTOX绿核酸染料进行测量,所述染料易于渗透具有受损膜的线粒体。用SYTOX绿染色的受损的线粒体将具有比用SYTOX绿染色的未受损的线粒体更高的FITC信号强度。虽然储存在4℃下的线粒体具有FITC发射的立即增加,但储存在-80℃下的线粒体在整个储存期间(长达7个月)保留了与新鲜分离的线粒体可比较的膜电位(图35B)。

[0383] 为了确定表征参数的变化是否转变为功能能力的变化,使用甲萘醌诱导的ROS过度生产模型,来评价储存的线粒体减少HPAEC中的趋化因子分泌的能力。在评价所有参数之前,HPAEC与25μM甲萘醌一起培养5小时,同时伴随或不伴随以50个颗粒/细胞的线粒体处理。这些实验中使用的线粒体在非保存条件(在4℃下储存)或保存条件(在-80℃下储存)下

储存0小时(新鲜线粒体)、24小时、48小时和72小时。使用其为基于珠的免疫测定的LEGENDplex™ Human Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend®, San Diego, CA), 通过流式细胞术测量所处理的HPAEC的培养基中的趋化因子。珠通过大小和内部荧光强度进行区分。每个珠集合在其表面上与特异性抗体缀合, 并且充当关于特异性分析物(趋化因子)的捕获珠。当混合所选小组的捕获珠并与含有对于捕获抗体特异性的靶分析物的样品一起温育时, 每种分析物将结合其特异性捕获珠。在洗涤后, 加入生物素化的检测抗体混合物(cocktail), 并且混合物中的每种检测抗体将与其在捕获珠上结合的特异性分析物结合, 因此形成捕获珠-分析物-检测抗体夹心。随后添加链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白(SA-PE), 其将与生物素化的检测抗体结合, 提供与结合分析物的量成正比的荧光信号强度。由于珠在流式细胞仪上通过大小和内部荧光强度进行区分, 因此可以分离分析物特异性群体, 并且可以定量PE荧光信号。使用以相同测定法生成的标准曲线来确定目的分析物的浓度。

[0384] 通过基于珠的免疫测定分析的趋化因子包括IL-8/CXCL8、MIG/CXCL9、MCP-1/CCL2和GRO α /CXCL1。IL-8是对于嗜中性粒细胞具有独特特异性的趋化性细胞因子(即趋化因子)。IL-8将嗜中性粒细胞吸引到炎症部位, 然后它在其中帮助激活其。MIG是在将活化T细胞募集到炎症部位时发挥重要作用的趋化因子。MIG参与Th1/Th2极化(吸引Th1细胞并抑制Th2迁移)。MIG在IFN- γ 信号放大后产生, 并且可以充当激活的有用读出。MCP-1是控制单核细胞和巨噬细胞向炎症部位募集的趋化因子。GRO α 是在炎症的早期阶段控制嗜中性粒细胞募集的趋化因子。

[0385] 基于珠的免疫测定结果在图36中呈现为相对于用25 μ M甲萘醌+0个线粒体/细胞处理的细胞的百分比改善。与保留了减少趋化因子分泌的能力的储存在-80 $^{\circ}$ C下的线粒体相比, 储存在4 $^{\circ}$ C下的线粒体快速失去了其调节IL-8/CXCL8(图36A)、MIG/CXCL9(图36B)、MCP-1/CCL2(图36C)和GRO α /CXCL1(图36D)分泌的能力。这些结果显示, 分离的猪线粒体在-80 $^{\circ}$ C下的冷储存后保留线粒体功能。

[0386] 如图37中所示, 储存在-80 $^{\circ}$ C下的线粒体具有与新鲜分离的线粒体相同的总体形态(图37A)和平均大小(图37B)。评分为I类的线粒体具有浓缩的正常状态(即未受损状态), 其由邻接的电子致密基质腔中的许多狭窄的多形嵴代表。评分为II类的线粒体处于以重新组构的嵴和基质腔为特征的重塑状态。重塑状态的出现与来自膜间隙的细胞色素c的重新分布和可用性在时间上相关联。评分为III类的线粒体是肿胀且受损的。III类线粒体具有完整的膜, 但这些线粒体的嵴已退化并接近于线粒体周边聚集。评分为IV类的线粒体最终肿胀或破裂。IV类线粒体显示总体形态紊乱, 包括基质的不对称起泡。评分为“浓缩基质(CM)”的线粒体具有浓缩基质, 没有限制性外膜。

[0387] 为了评价完整的线粒体是否是线粒体处理中的功能组分, 通过离心从在-80 $^{\circ}$ C下储存两周的线粒体获得线粒体级分和非线粒体级分。HPAEC与25 μ M甲萘醌一起培养, 并用线粒体级分或非线粒体级分进行体积处理。0.02%、0.2%、2%和20%的体积分别对应于1个线粒体/细胞、10个线粒体/细胞、100个线粒体/细胞和1000个线粒体/细胞。分析的参数包括炎性趋化因子IL-8/CXCL8(图38A)、MCP-1/CCL-2(图38B)和GRO α /CXCL-1(图38C)的分泌, 以及乳酸脱氢酶(LDH)的释放(图38D), 其指示了细胞损害。所有结果在图38中呈现为相对于用25 μ M甲萘醌和0个线粒体/细胞(0%体积)处理的HPAEC的百分比改善。单独的线粒体级

分保留了减少趋化因子分泌和LDH释放的能力。因此,线粒体是线粒体处理中的功能组分,与在-80℃下储存后从线粒体中释放的组分或从分离过程中遗留下来的组分形成对比。

[0388] 实施例10

[0389] 在保存条件下长期储存的分离的猪线粒体改善了体内肾功能和恢复

[0390] 缺血/再灌注(I/R)小鼠模型用于评价在长期保存条件下储存的分离的猪线粒体改善体内肾功能和恢复的能力。本研究中使用的线粒体在注射到小鼠内之前在-80℃(保存条件)下储存了大约一个月。通过夹住肾动脉45分钟随后为再灌注,在成年小鼠中实现了急性I/R损伤。在第1天时,在再灌注后,小鼠用线粒体(0.01x或0.1x剂量)或媒介物对照进行注射。如图39A中所示,其为肾功能指标的血尿素氮(BUN)在I/R损伤后增加,并在线粒体注射(0.1x剂量)后的第2天和第4天时趋于降低。其为由肾占据的小鼠重量百分比的肾指数在I/R损伤后增加,并在线粒体注射(0.01x剂量)后减少,如图39B中所示。肾损伤分子-1(KIM1)是急性肾损伤的标记物。图39C显示,虽然I/R损伤增加了KIM1血清水平,但线粒体处理以剂量响应方式减少了这些水平。单核细胞趋化蛋白1(MCP1)是与急性肾损伤相关的促炎细胞因子。图39D显示,虽然I/R损伤增加了MCP1血清水平,但线粒体处理以剂量响应方式减少了这些水平。补体系统的C3a和C5a成员在缺氧/复氧后诱导来自肾小管上皮细胞和巨噬细胞两者的炎症介质。虽然I/R损伤增加了C3a(图39E)和C5a(图39F)血清水平,但线粒体处理以剂量依赖性方式减少了这些水平(图39E-F)。

[0391] 总之,这些数据显示,在保存条件下长期储存的分离的猪线粒体可以施用于受试者,以改善损伤后的肾功能和恢复。

[0392] 实施例11

[0393] 用分离的猪线粒体处理改善了损伤后的肺功能

[0394] 为了制备用于离体肺灌注(EVLP)的肺,使猪肺膨胀,并且将气管夹住。在EVLP之前,将肺在4摄氏度下储存大约20小时。肺动脉(PA)和主支气管(气管)在冰上进行插管。左心房(LA)保持开放,以允许灌注液从肺自由流出。在5小时的EVLP期间,对肺进行通气并用37℃的Steen溶液进行灌注,所述Steen溶液用碳酸氢盐进行缓冲,并用5%CO₂、95%N₂进行脱氧。使用体积控制的通气,其中压力上限为25cmH₂O。PA灌注以100ml/min开始,并在大约30-45分钟内增加到30%的心输出量。在EVLP期间,灌注保持恒定。在线粒体注射之前,通过在100%的FiO₂下测量PA和LA PO₂来评价气体交换。此时还记录了生理参数,例如动态顺应性。紧在基线之后和3小时EVLP后,将线粒体或呼吸缓冲液(对照)注射到PA线内。在基线后15分钟、1小时、2小时、3小时、4小时和5小时进行EVLP评价,包括气体交换。这些实验中使用的线粒体在使用前储存在保存条件下(储存在-80℃下)(储存24小时至1个月)。

[0395] 在大约20小时的冷缺血时间后,对分离的猪尸体肺运行EVLP。如图40中所示,在冷缺血损伤之后置于EVLP下的分离的猪尸体肺中,猪线粒体处理改善了间隙连接标记物的表达并减少了DNA氧化。特别地,在1小时后在上叶中以及在4小时后在尾叶远段、尾叶近段和上叶中测量时,线粒体处理改善了EVLP中的间隙连接标记物JAM1(图40A)和CD31(图40B)表达。在1小时后在上叶中以及在4小时后在尾叶远段、尾叶近段、下叶和上叶中测量时,线粒体处理还降低了在EVLP期间的肺组织中ROS诱导的DNA激活标记物8-OHdG的表达(图40C)。

[0396] 肺组织在4℃下储存过夜,其后制备肺组织匀浆。匀浆用增加剂量的线粒体进行处理,并在标准培养条件下温育过夜。如图41A-B中所示,在冷缺血损伤之后的分离的猪尸体

肺中,猪线粒体处理减少了炎性细胞因子表达或分泌。特别地,在1小时EVLP后的上叶中以及在4小时EVLP后的尾叶远段、尾叶近段和上叶中,线粒体处理降低了在EVLP期间的循环IL-6(图41A),并降低了肺组织裂解物的IL-8水平(图41B)。

[0397] 在EVLP期间,测量分离的猪尸体肺的肺血管阻力(PVR)。在分析中包括了在3小时的EVLP时间用媒介物进行处理的6个肺(“对照”)、以及在3小时的EVLP时间用线粒体进行处理的5个肺(“线粒体”)(图42A)。图42B中显示了单个线粒体处理的肺,以证实线粒体注射可以如何在3小时注射时肉眼可见。图42A和图42B中的虚线代表线粒体注射的时间。图42B中的箭头代表在其下评价气体交换的时间。在每次评价之间是募集事件。这些结果显示,在EVLP期间的线粒体注射通过降低PVR改善了肺功能。

[0398] 还评估了线粒体处理对信号传导途径的影响。使分离的猪尸体肺暴露于大约20小时的冷缺血时间,这之后对肺运行EVLP 5小时。从对照缓冲液注射的肺或线粒体注射的肺中收集远尾端和近尾端肺组织,并经受RNA测序。如图43中所示,线粒体处理降低了在冷缺血损伤之后置于EVLP下的肺中的炎症和凋亡信号传导途径。

[0399] 总之,这些结果显示,用分离的猪线粒体处理肺通过增加间隙连接标记物的表达,且通过减少DNA氧化、炎性细胞因子产生、细胞凋亡和PVR,改善了在损伤之后的肺功能。因此,可以在EVLP期间实施猪线粒体处理,以改善肺活力和功能。

[0400] 实施例12

[0401] 线粒体处理改善了暴露于损害性或令人痛苦的条件的细胞或器官组织的活力和功能

[0402] 健康细胞需要严格调控量的ROS以正常地发挥功能。当ROS生成增加超过一定水平时,它变得对细胞损害性的,并对细胞组分包括核酸、脂质和蛋白质产生ROS介导的损害。为了评估线粒体处理对ROS生成的作用,HPAEC与25 μ M的ROS诱导剂甲萘醌一起培养5小时,伴随或不伴随线粒体处理。通过竞争性ELISA在处理细胞的裂解物中测量氧化性应激标记物4-HNE和8-OHdG。如图44A-B中所示,线粒体处理有效地将4-HNE加合物和8-OHdG的水平减少至正常(无甲萘醌处理)水平。通过流式细胞术就分泌的趋化因子的存在分析处理细胞的细胞培养物上清液。如图44C-E中所示,线粒体处理有效地将IL-8/CXCL8、MCP1/CCL2、MIG/CXCL9和GR α /CXCL1的分泌减少至正常(无甲萘醌处理)水平。用于这些实验的线粒体在使用之前在-80 $^{\circ}$ C下储存1周。

[0403] 除ROS介导的损伤之外,预定用于移植的器官还经常遭受冷/复温损伤。在细胞水平下,当温度降低时,细胞改变其代谢功能并耗尽其ATP储存。随着细胞或器官复温,ATP的需求和消耗增加。在线粒体水平下,存在mPTP的延长开放,伴随膜电位的后续丧失和氧化性应激的增加。由于细胞已耗尽其储存的ATP,它没有准备好发动正常的细胞代谢,其导致细胞损伤、坏死体的启动和激活、以及最终的死亡/破裂和细胞内容物的渗漏,导致强烈的炎症应答。为了在二维(2D)培养模型中复制这种损伤模式,HPAEC在4 $^{\circ}$ C下培养24小时(低温条件)并在37 $^{\circ}$ C下复温4小时(常温条件),如图45A中所示。处理组包括在低温开始用线粒体处理的HPAEC和在复温时用线粒体处理的HPAEC。在4小时的复温期后,使用4-HNE加合物竞争性ELISA定量HPAEC裂解物中的4-HNE蛋白加合物来测量ROS介导的损害。4-HNE加合物形成对于线粒体处理非常敏感,因为非常低剂量的线粒体能够具有影响(图45B)。在4小时的复温期后还测量了细胞活力。结果在图45C中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没

有线粒体处理的HPAEC)的相对光单位(RLU)。与未处理的HPAEC相比,线粒体处理产生了细胞活力的2-3倍增加(图45C)。

[0404] 还使用图45A中所示的2D培养模型,来评价线粒体处理对经受冷/复温损伤的HPAEC坏死的作用。处理组包括在低温开始时用线粒体处理的HPAEC和在复温时用线粒体处理的HPAEC。在4小时的复温期后,使用细胞不可渗透的促荧光DNA染料测量坏死性细胞死亡。活细胞将排除这种染料,但具有受损的膜完整性的坏死细胞将允许染料进入。结果在图46A中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)的相对光单位(RLU)。正常的、无应激的HPAEC对照在图46A中由虚线表示。用线粒体处理的HPAEC显示坏死的剂量依赖性降低(图46A)。

[0405] 坏死性细胞死亡的一个标志是MLKL的磷酸化。使用夹心ELISA测量磷酸化MLKL(pMLKL)和总MLKL,来分析在图45A中所示的2D培养模型中的4小时升温期后收集的HPAEC裂解物。将抗泛MLKL抗体包被到96孔板上。在选定的孔中,添加兔抗磷酸化MLKL(Ser358/345)抗体,以检测磷酸化的MLKL。在剩余的孔中,使用兔抗泛MLKL抗体,以检测泛MLKL。结果在图46B中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)的在450nm波长下测量的光密度(OD_{450})。正常的、无应激的HPAEC对照在图46B中由虚线表示。用线粒体处理的HPAEC显示pMLKL水平的剂量依赖性降低(图46B)。总MLKL水平没有变化(数据未显示)。

[0406] 高迁移率族蛋白B1(HMGB-1)是一种由经历坏死的细胞被动释放的遍在核蛋白。通过夹心ELISA测量在图45A中所示的2D培养模型中的HPAEC培养物上清液中释放的HMGB-1。图46C中显示的结果归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)。与未处理的细胞相比,线粒体处理减少了HMGB-1释放(图46C)。乳酸脱氢酶(LDH)是一种在细胞裂解时释放的稳定的胞质酶。HPAEC培养物上清液中释放的LDH用30分钟偶联酶促测定进行测量,所述测定导致四唑盐(INT)转换成红色甲臢产物。结果在图46D中显示为归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)的在490nm波长下测量的光密度(OD_{490})。正常的、无应激的HPAEC对照在图46C中由虚线表示。与未处理的细胞相比,线粒体处理减少了LDH释放(图46D)。

[0407] 线粒体处理对经受冷/复温损伤的HPAEC中ATP的总细胞水平的作用,也通过发光ATP检测测定使用从图45A中所示的2D培养模型获得的细胞裂解物进行评价。发光ATP检测测定允许检测细胞ATP的总水平,并且基于通过ATP与添加的萤火虫萤光素酶和萤光素的反应所引起的光产生。发射的光与细胞内的ATP浓度成正比。ATP降解酶(即ATP酶)在该测定的细胞裂解步骤期间不可逆地失活,以确保获得的发光信号真正对应于ATP的内源水平。处理组包括在低温开始时用线粒体处理的HPAEC和在复温时用线粒体处理的HPAEC,并在4小时的复温期后,测量细胞ATP的总水平。图47A中显示的结果归一化至基线(即暴露于冷/复温而没有线粒体处理的HPAEC)。与未处理的细胞相比,线粒体处理的HPAEC具有增加的ATP浓度(图47A)。在增加的ATP浓度和细胞活力之间存在正相关(图47B),并且在增加的ATP浓度和坏死之间存在负相关(图47C)。这些结果显示,线粒体处理增加了经受冷/复温损伤的细胞中细胞ATP的总水平,其与改善的细胞活力相关联。

[0408] 还在肺匀浆中评估了线粒体处理对细胞活力、坏死和细胞因子分泌的作用。为了评估细胞活力和坏死,在冷储存中的24小时后,收集肺的远端碎片,在0.1mg/mL DNA酶I/0.01%胶原酶溶液中进行酶促消化,用线粒体处理,并在评价之前置于常温(复温)细胞培

养条件下4小时。线粒体处理 (500个颗粒/mg或100个颗粒/mg) 基于湿组织重量,并且与本文所述的EVLP实验中使用的剂量相似。与未处理的肺匀浆相比,线粒体处理显著改善了细胞活力(图48A)并减少了坏死(图48B)。为了评估细胞因子的分泌,将肺组织在4℃下储存过夜,其后制备肺组织匀浆。匀浆用增加剂量的线粒体进行处理,并在标准培养条件(37℃)下温育过夜。如图49中所示,在冷暴露和匀浆化之后,线粒体处理降低了IL-6和IFN- γ 的分泌。

[0409] 总之,结果显示,线粒体处理减少了ROS介导的氧化副产物产生、ROS介导的趋化因子分泌、以及细胞和器官组织的冷/复温损伤。因此,在细胞或器官组织暴露于损害性或令人痛苦的条件(例如低温)之前或之后,用线粒体处理细胞或器官组织是有利的。

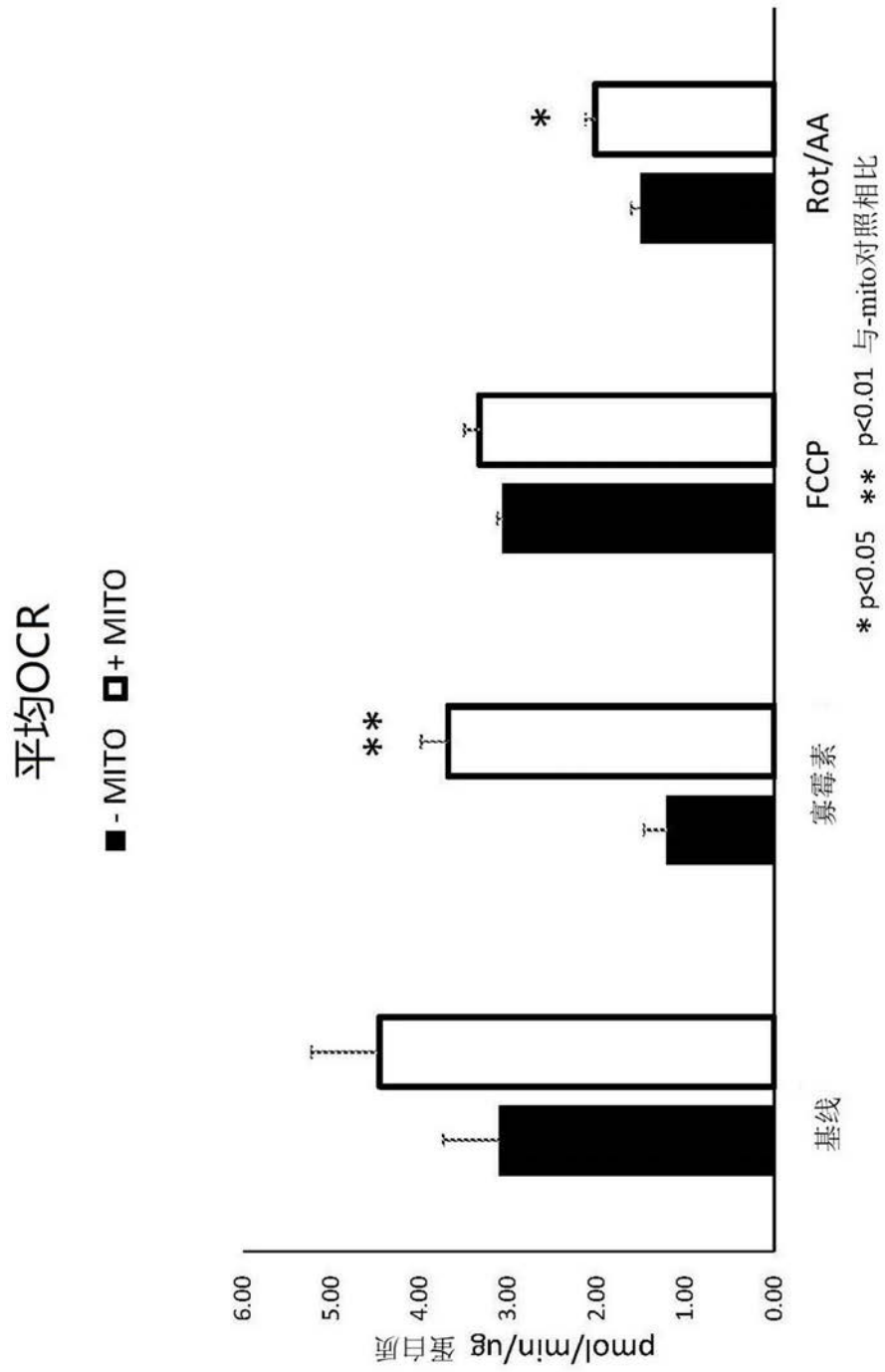


图1

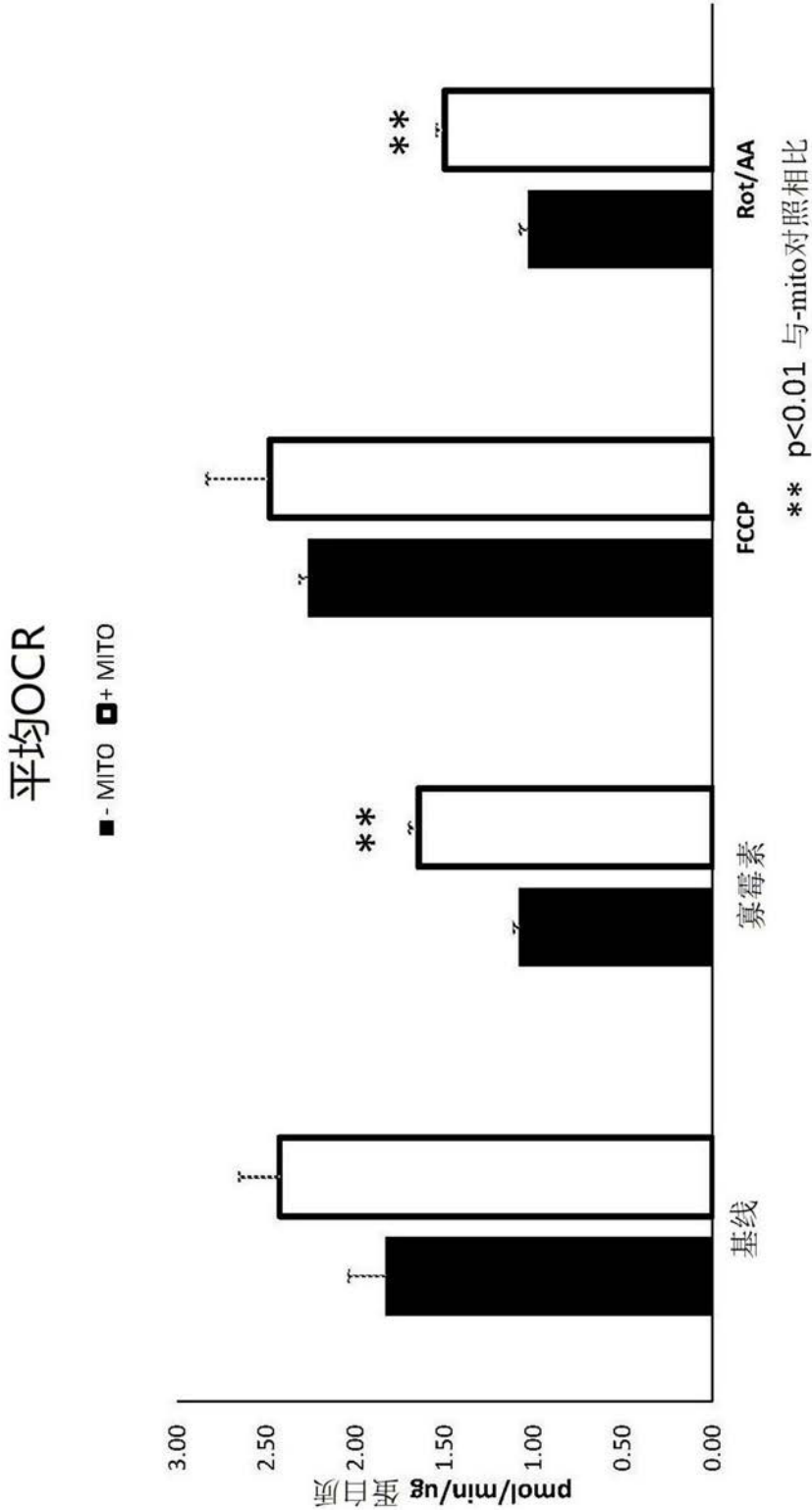


图2

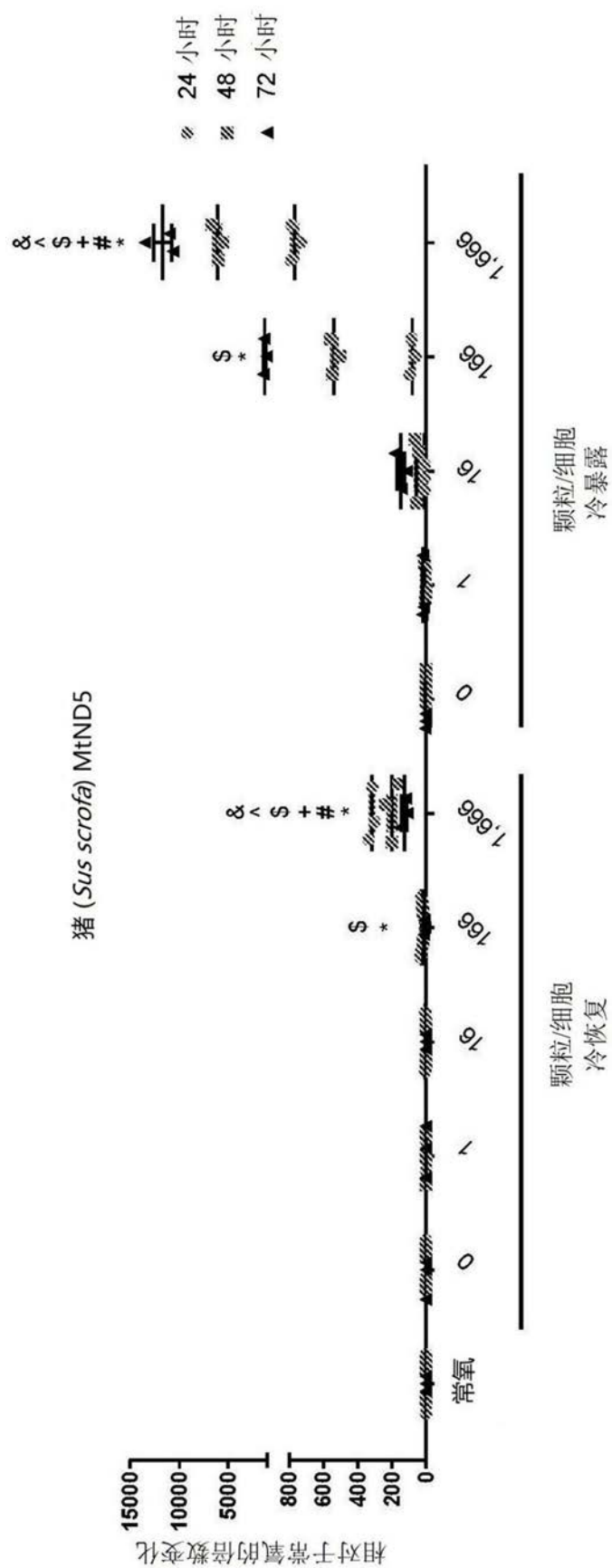


图3

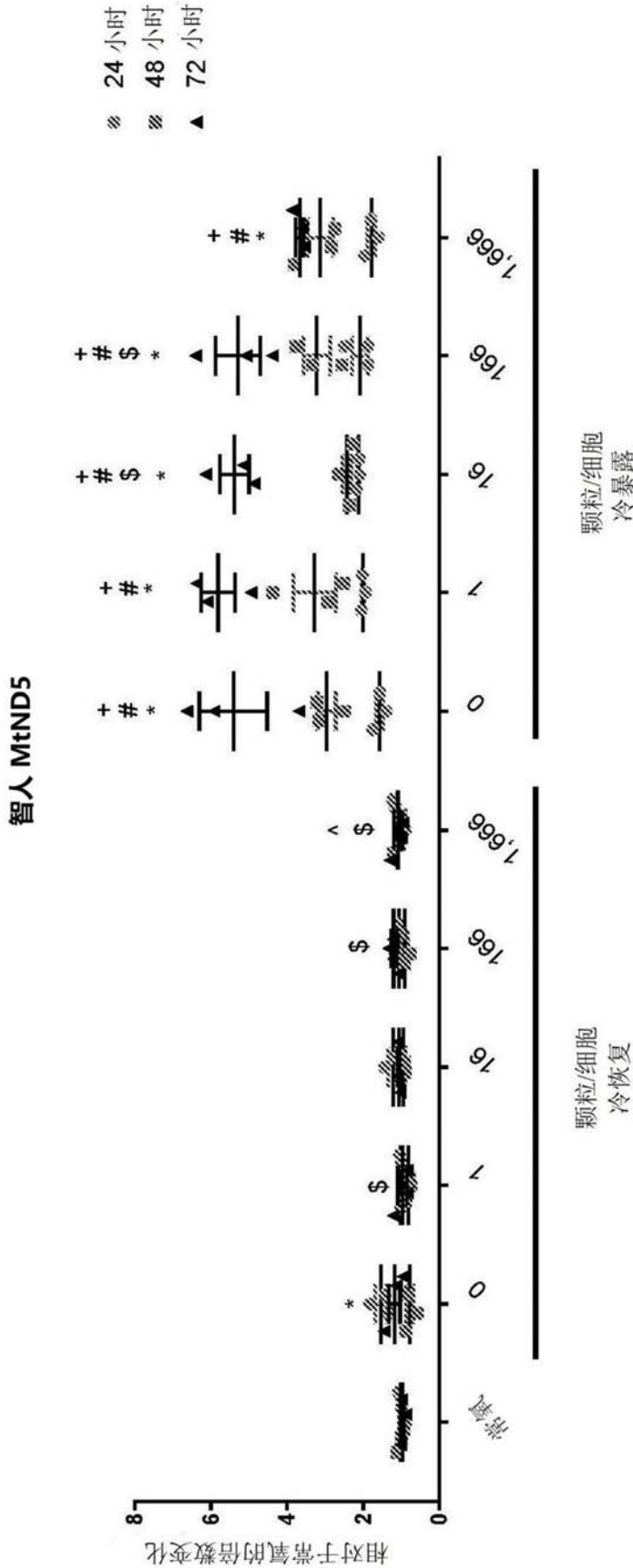


图4

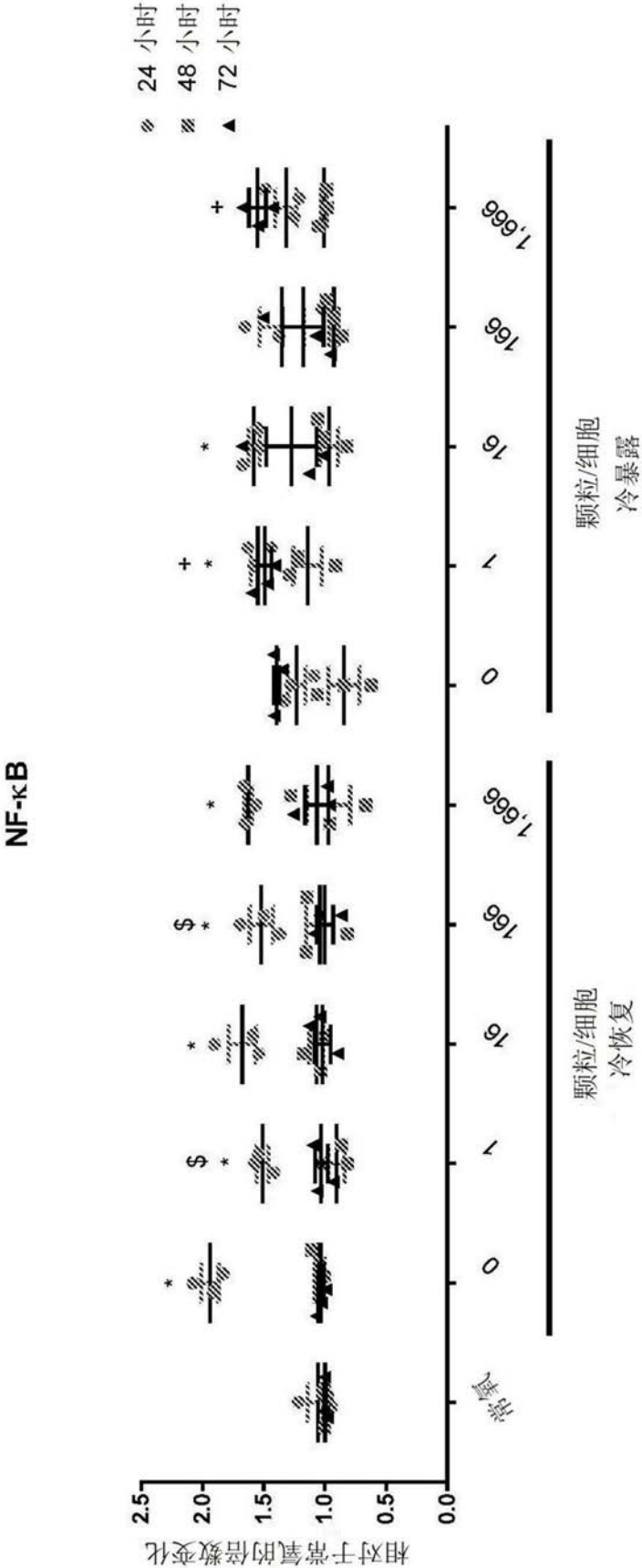


图5

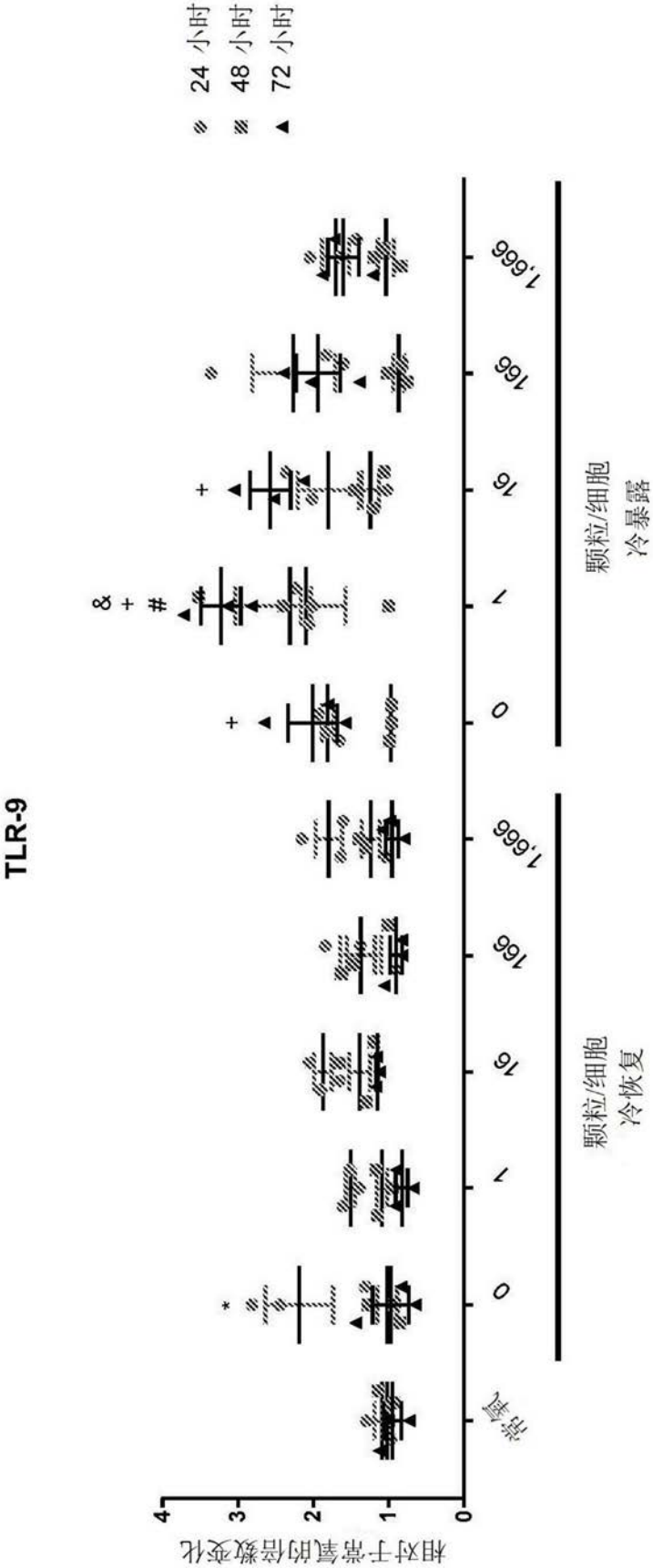


图6

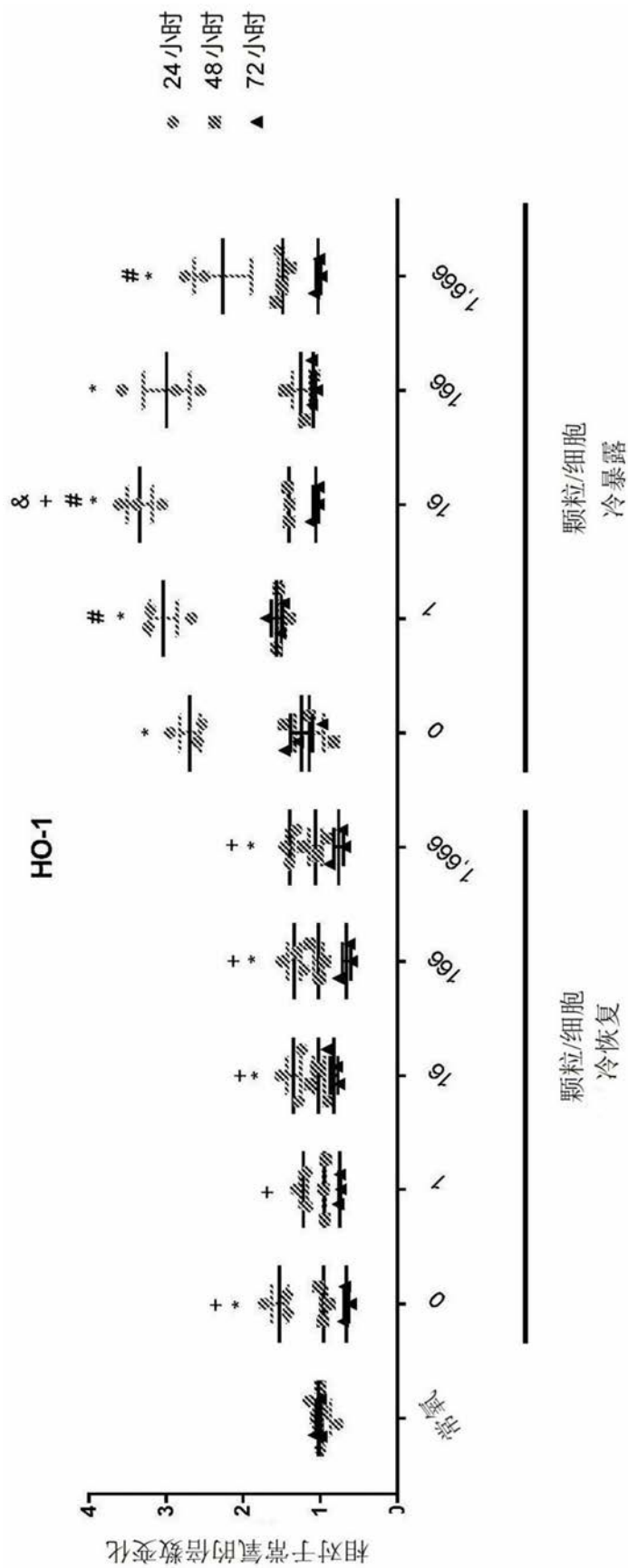


图7

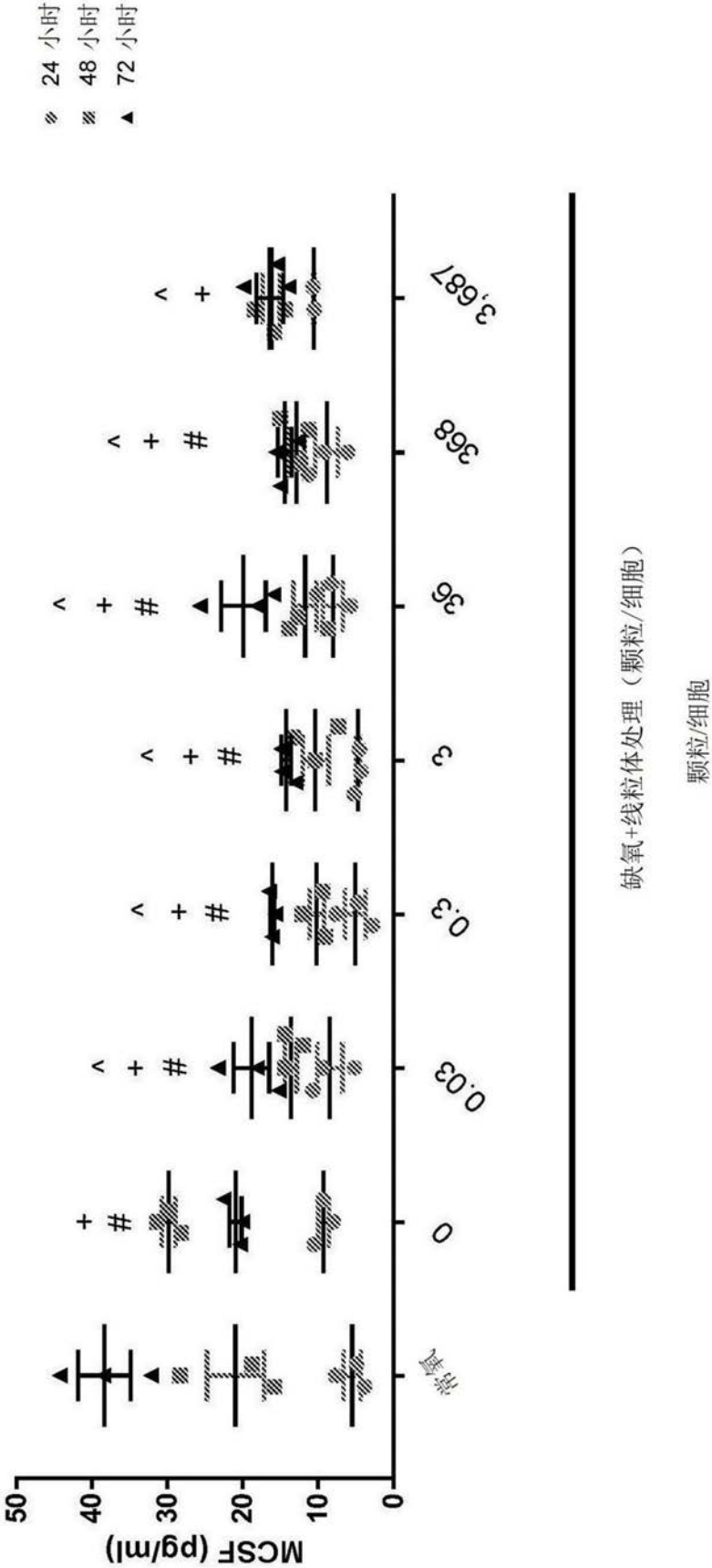


图8

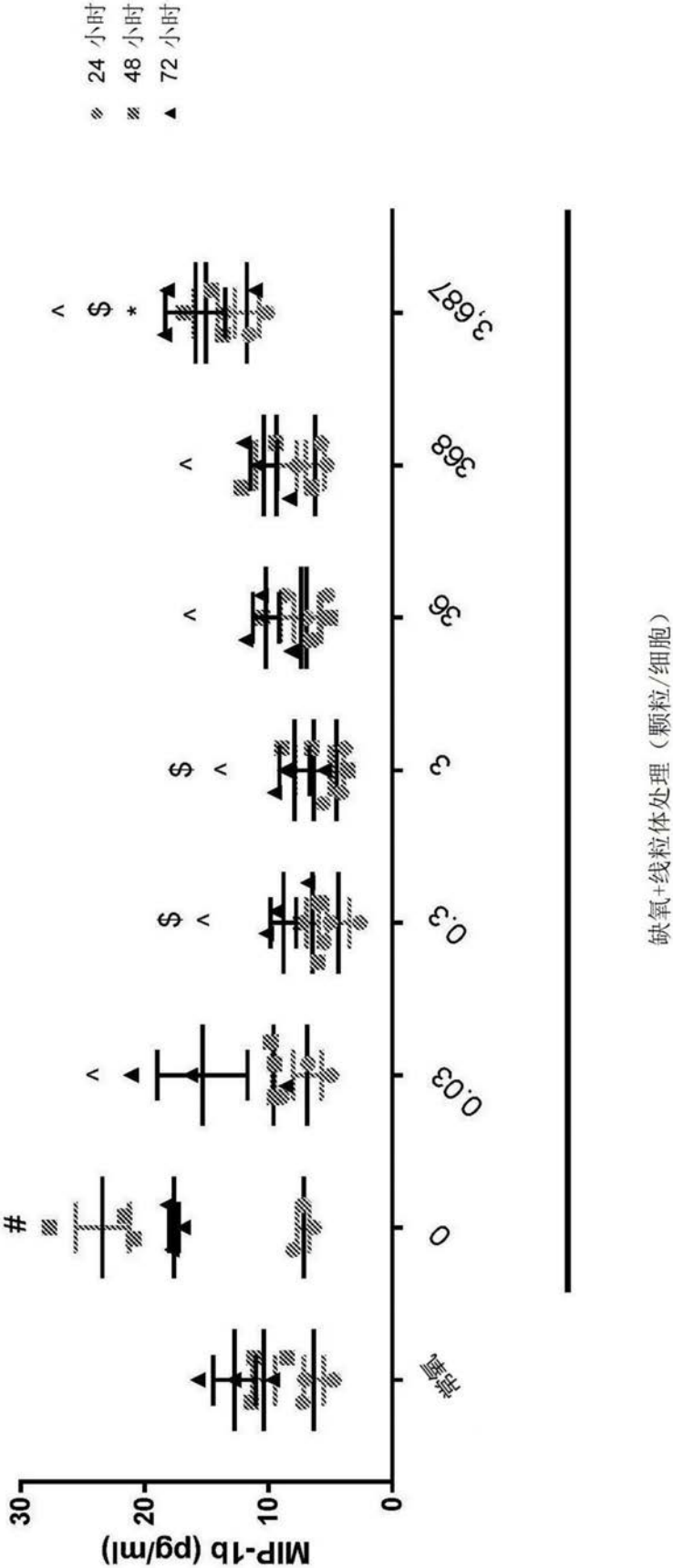


图9

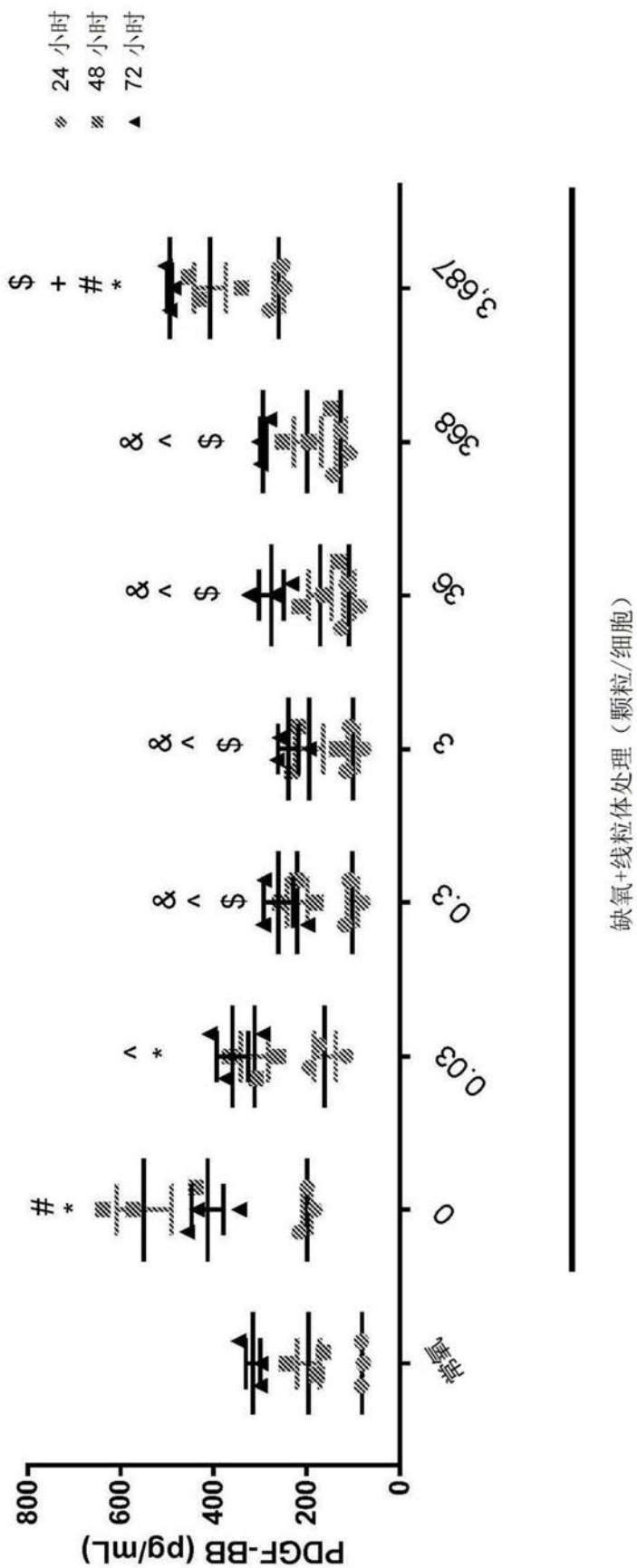


图10

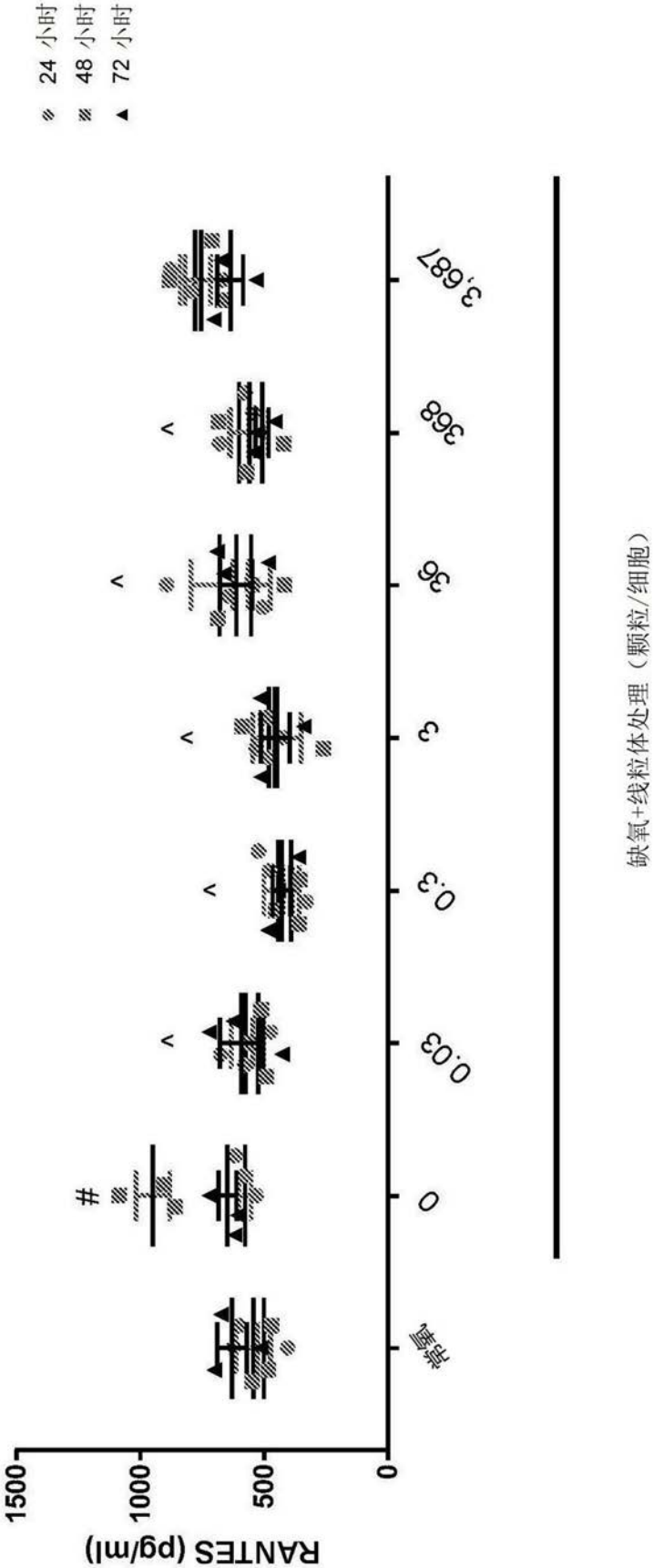


图11

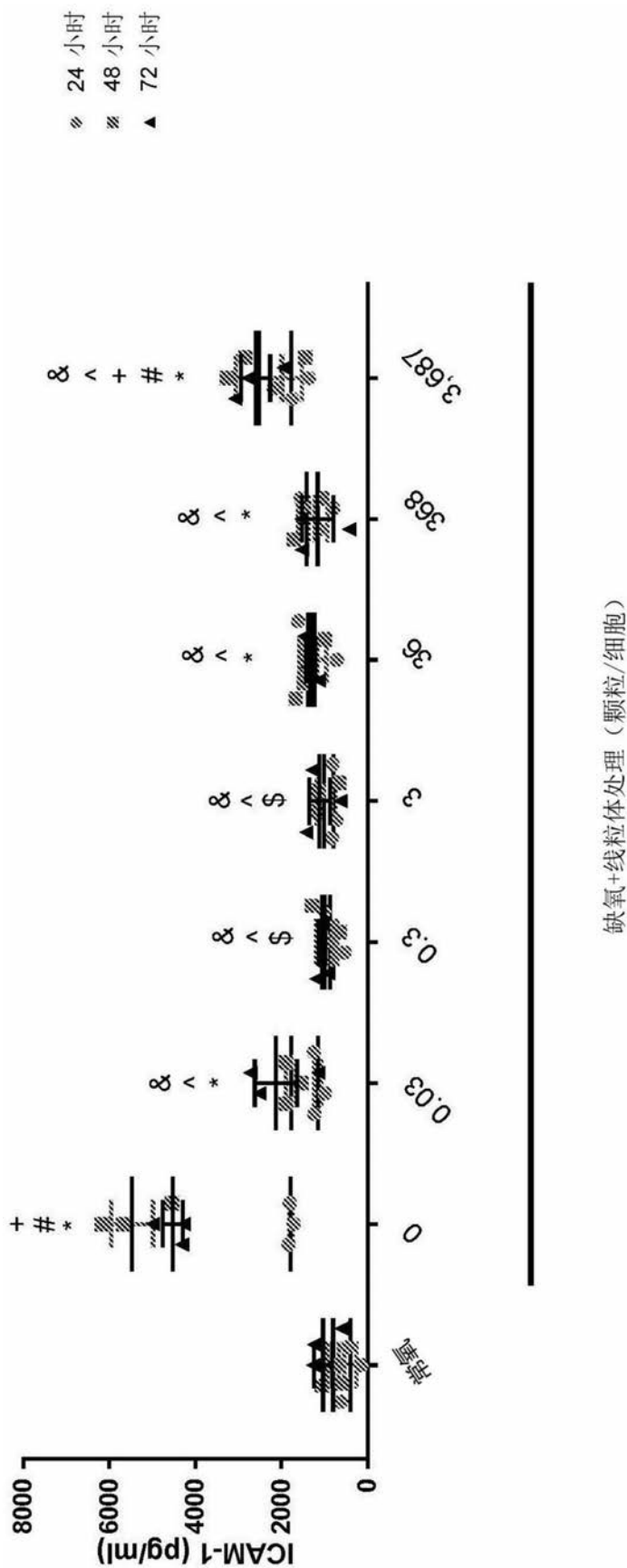


图12

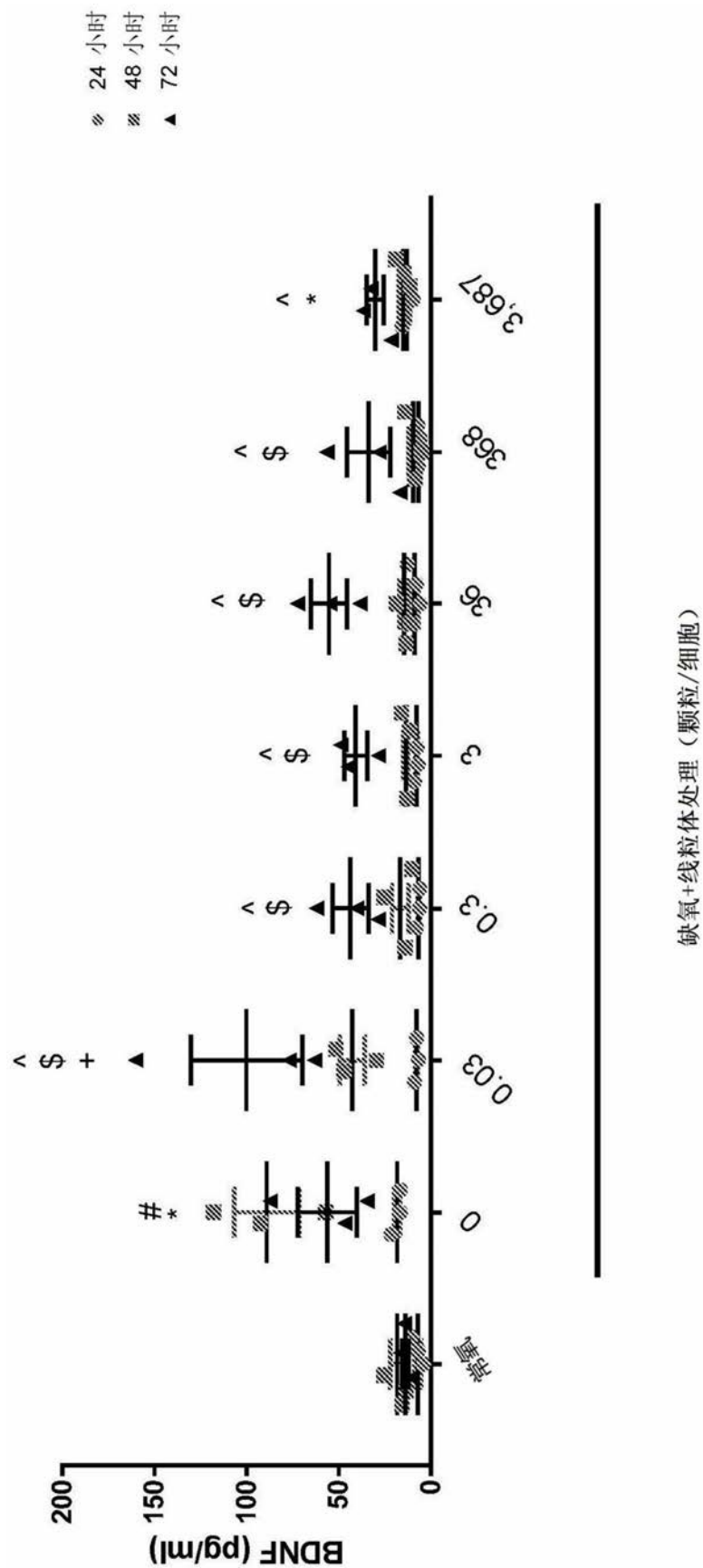


图13

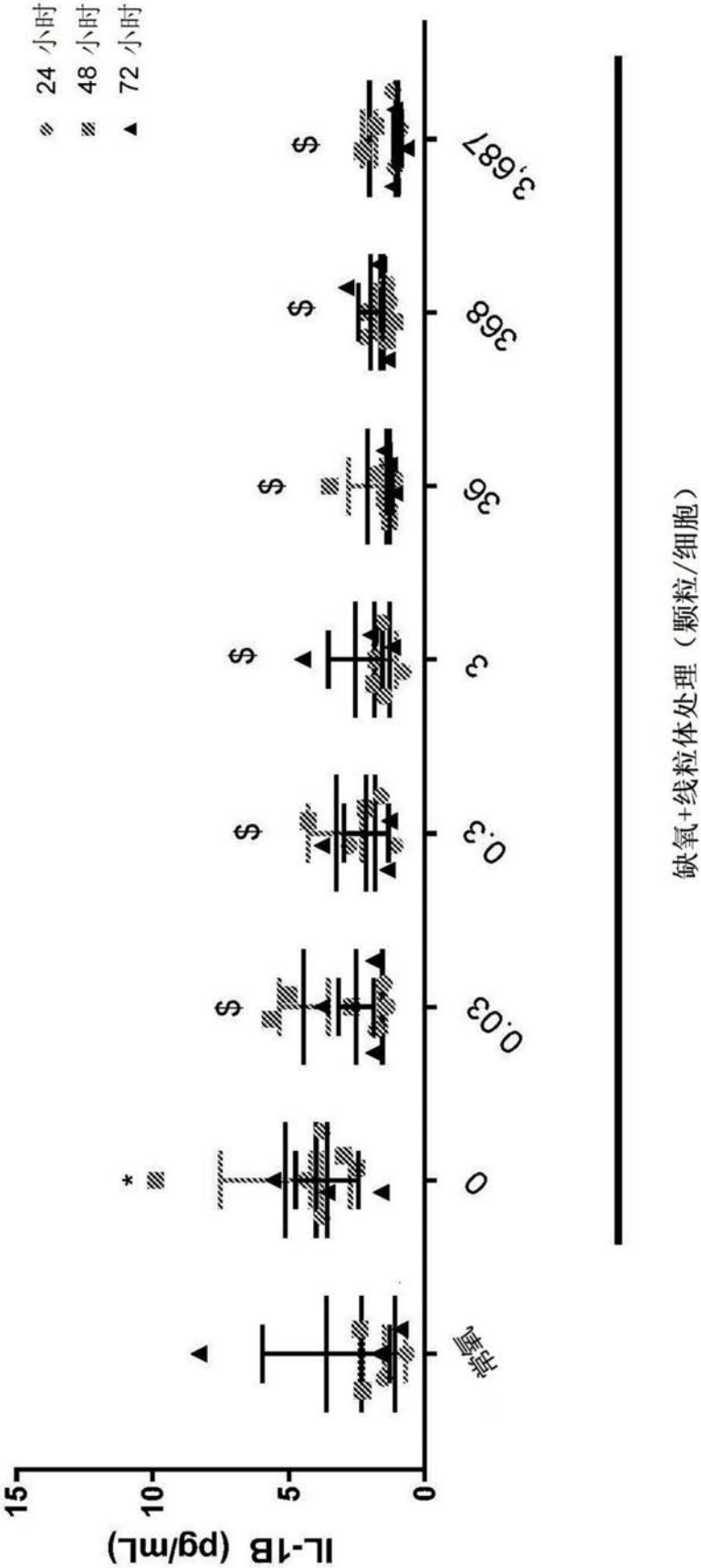


图14

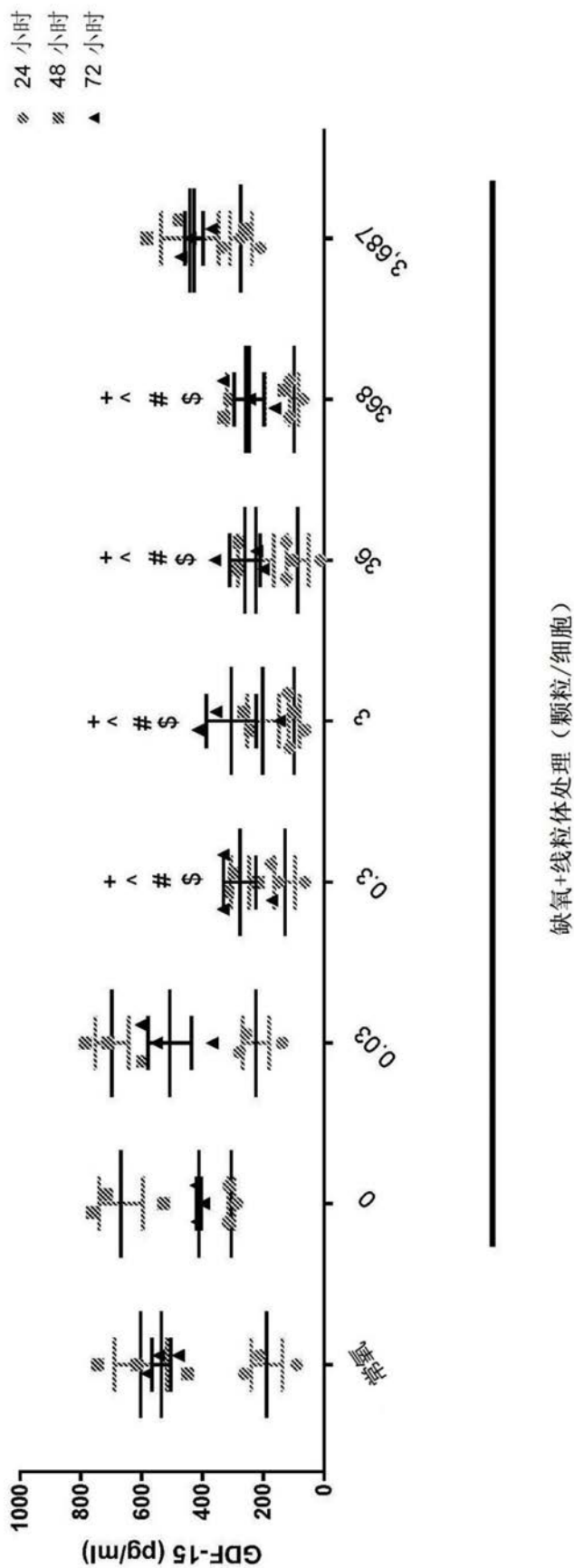


图15

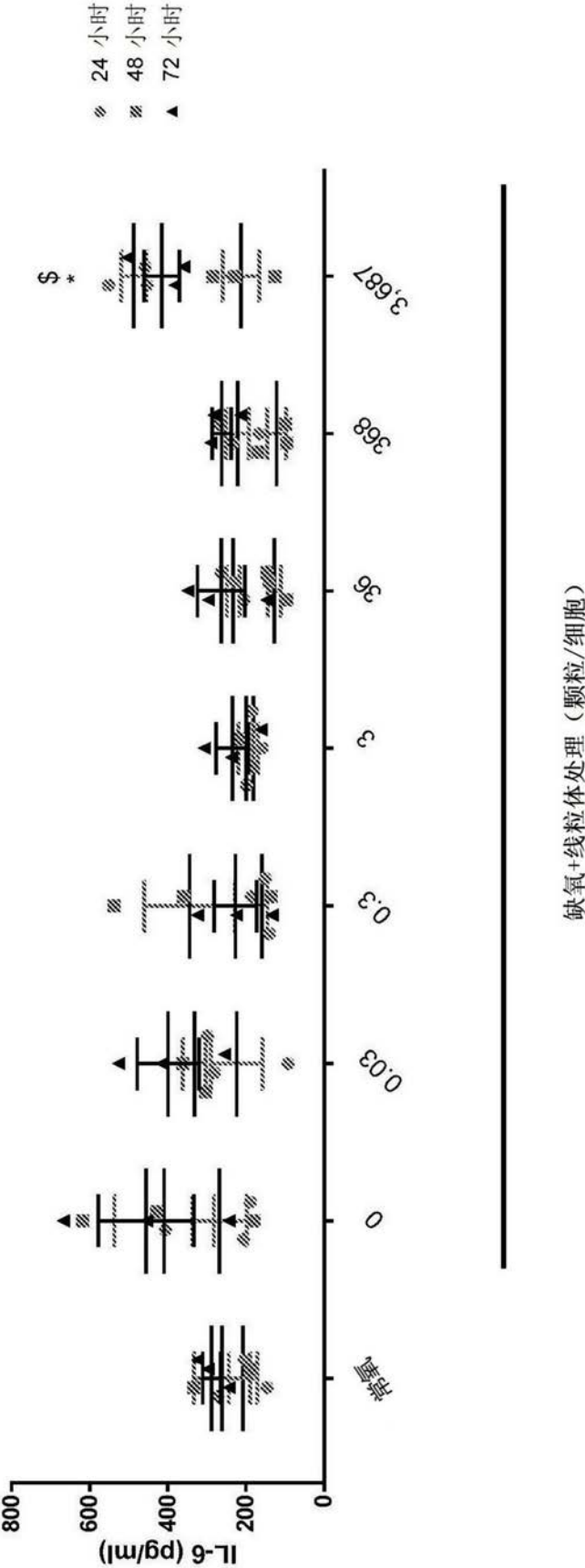


图16

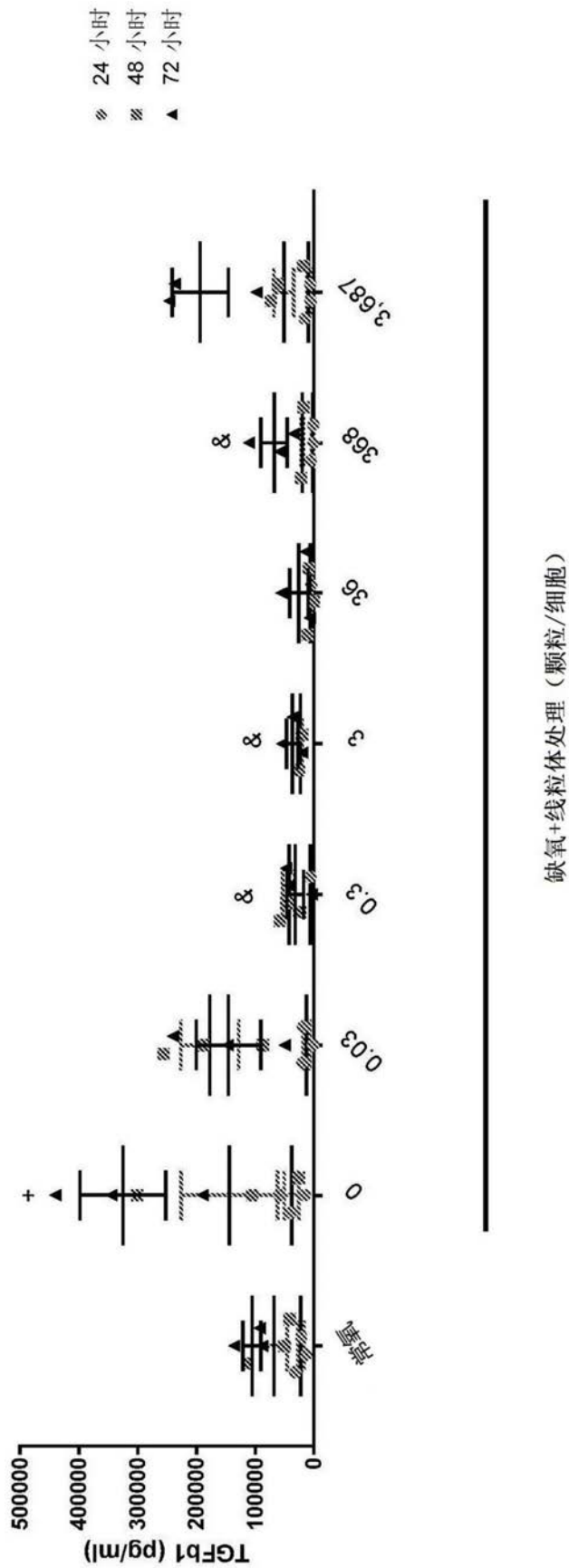


图17

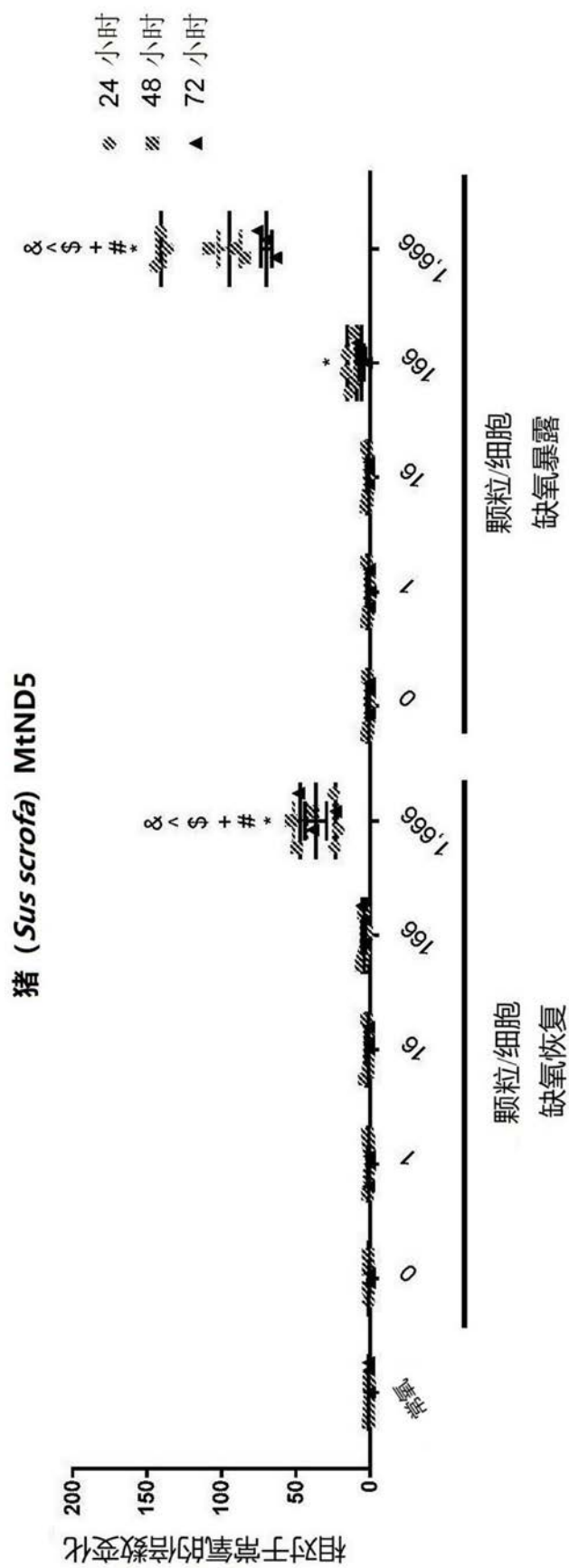


图18

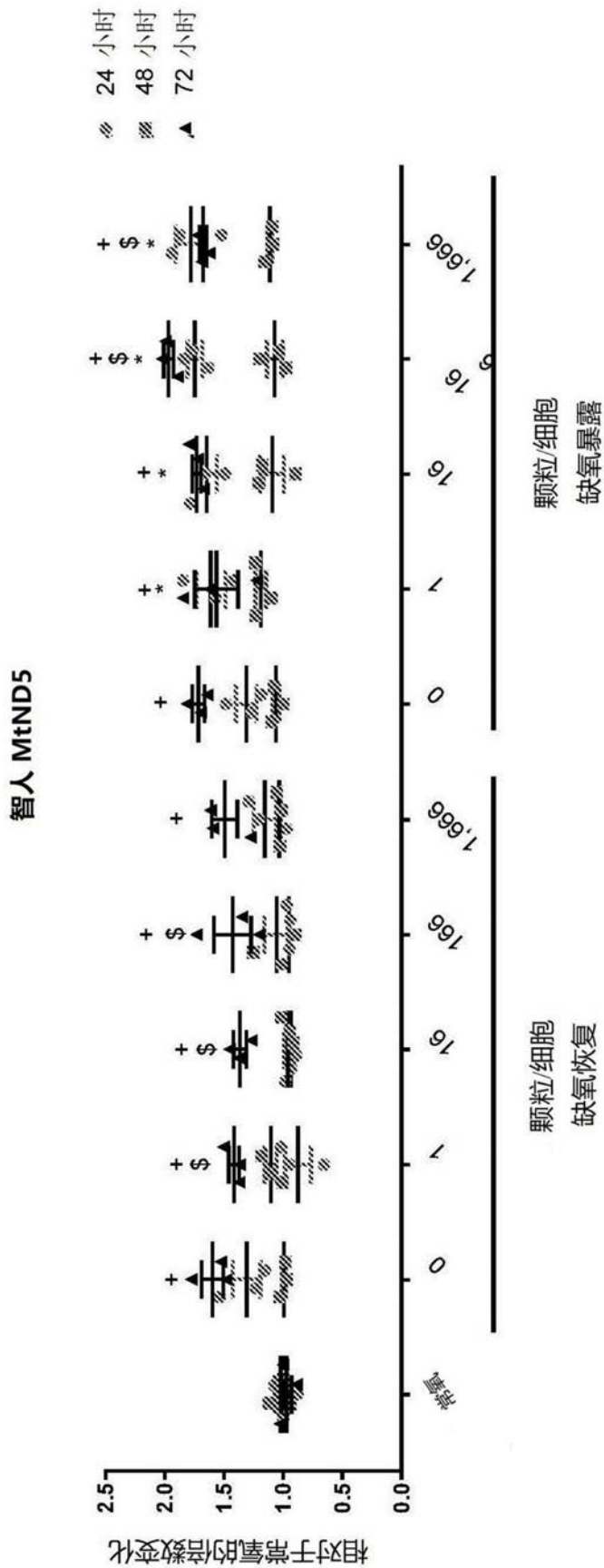


图19

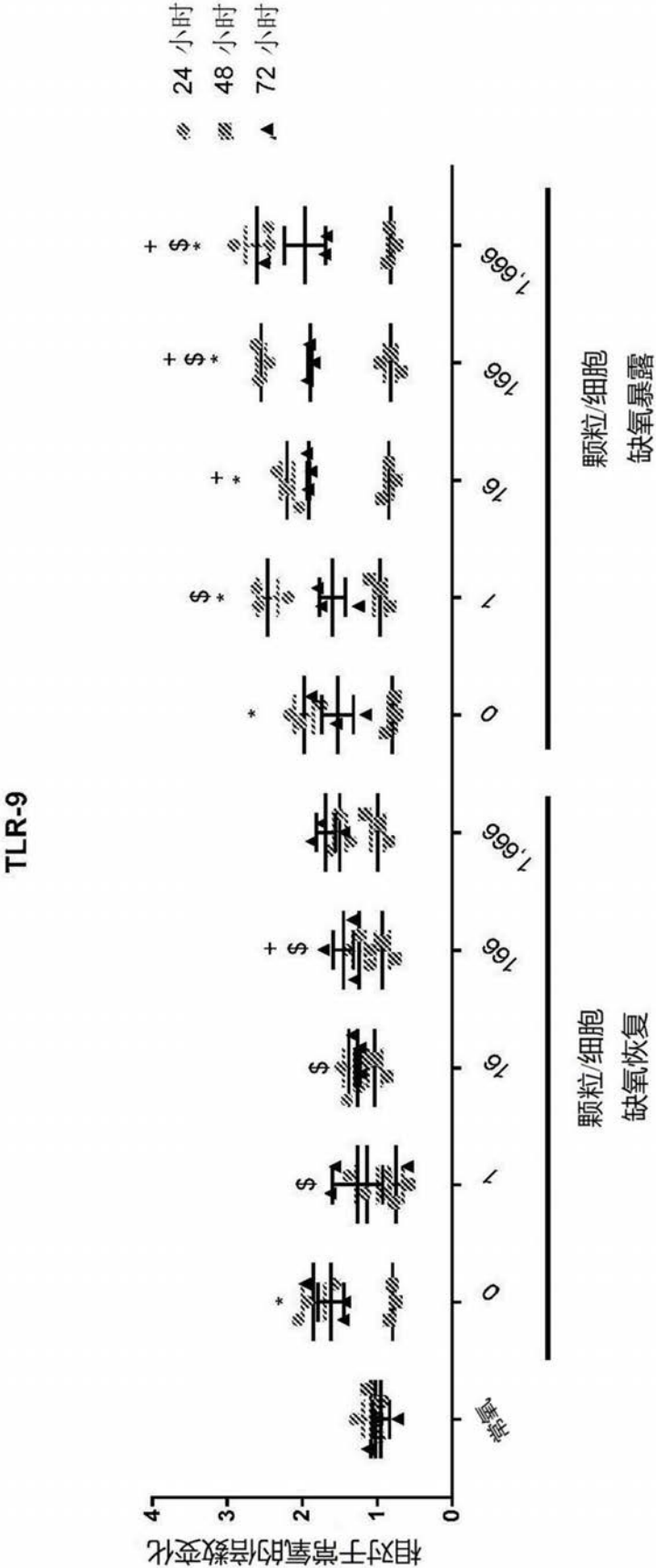


图20

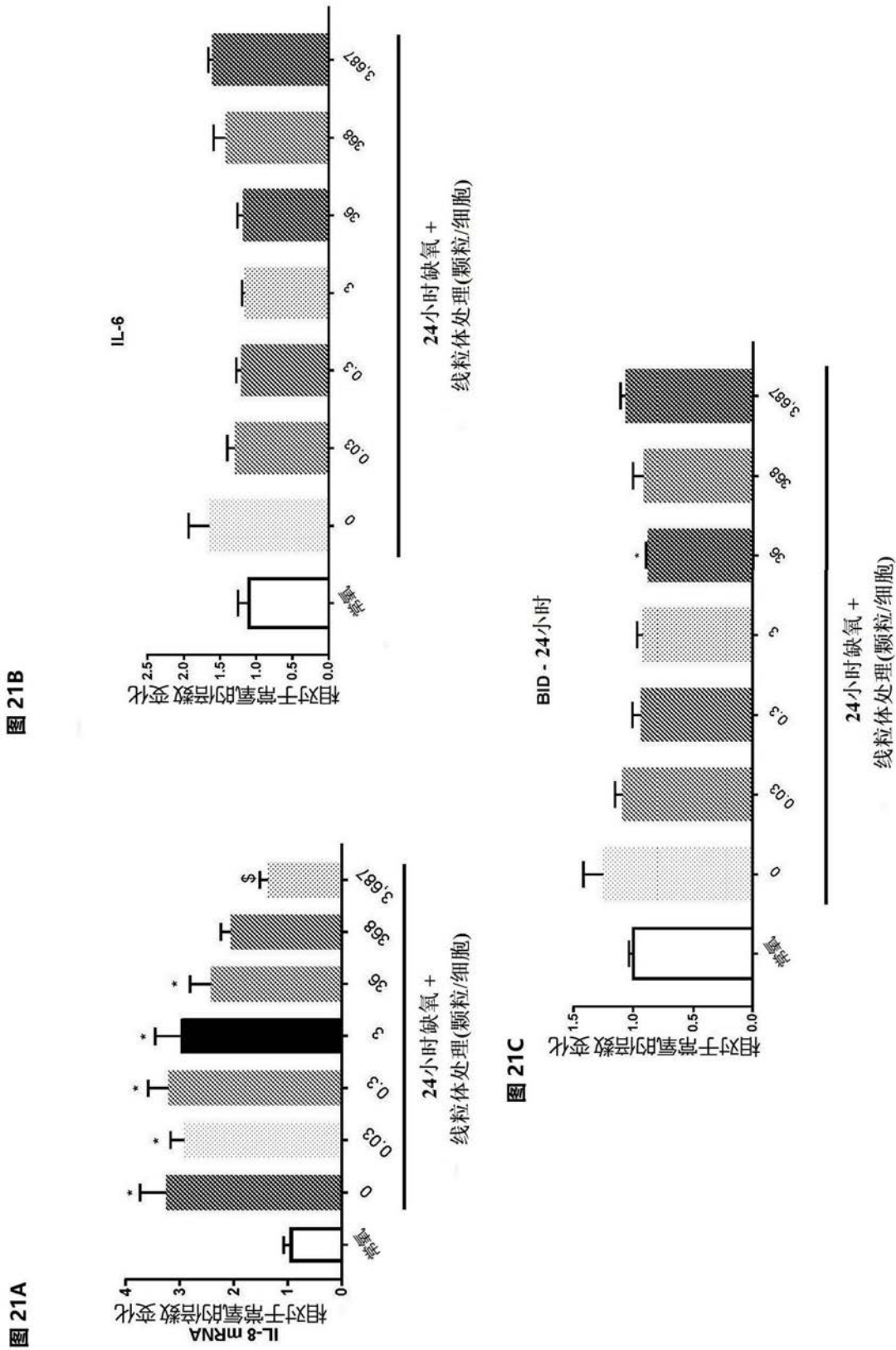


图21

图 21D

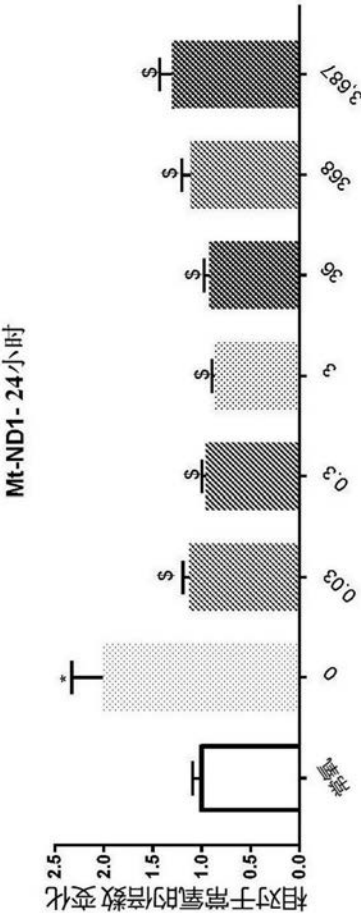


图 21E

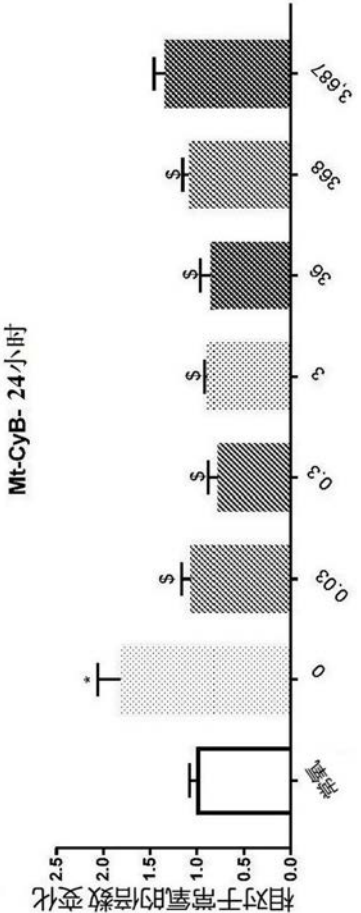


图21 (续)

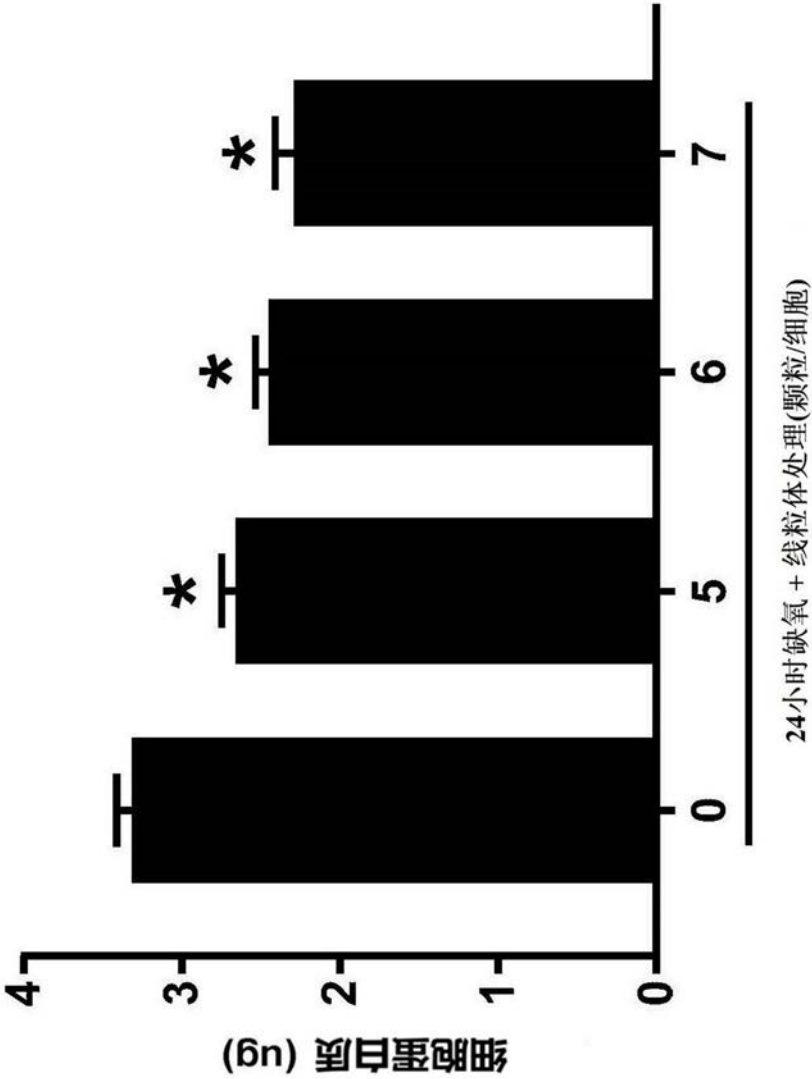


图22

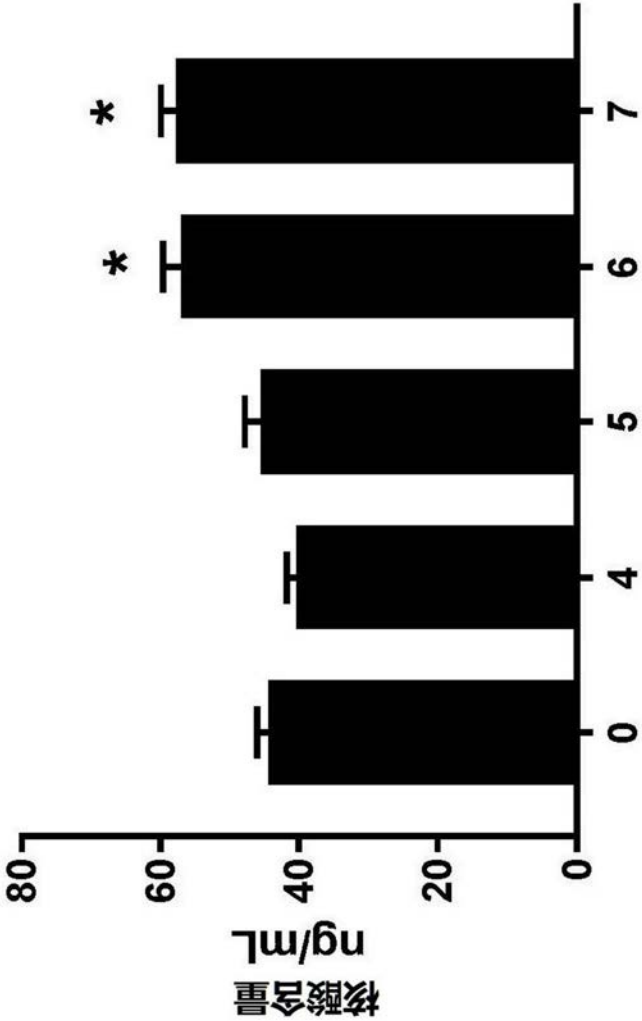


图23

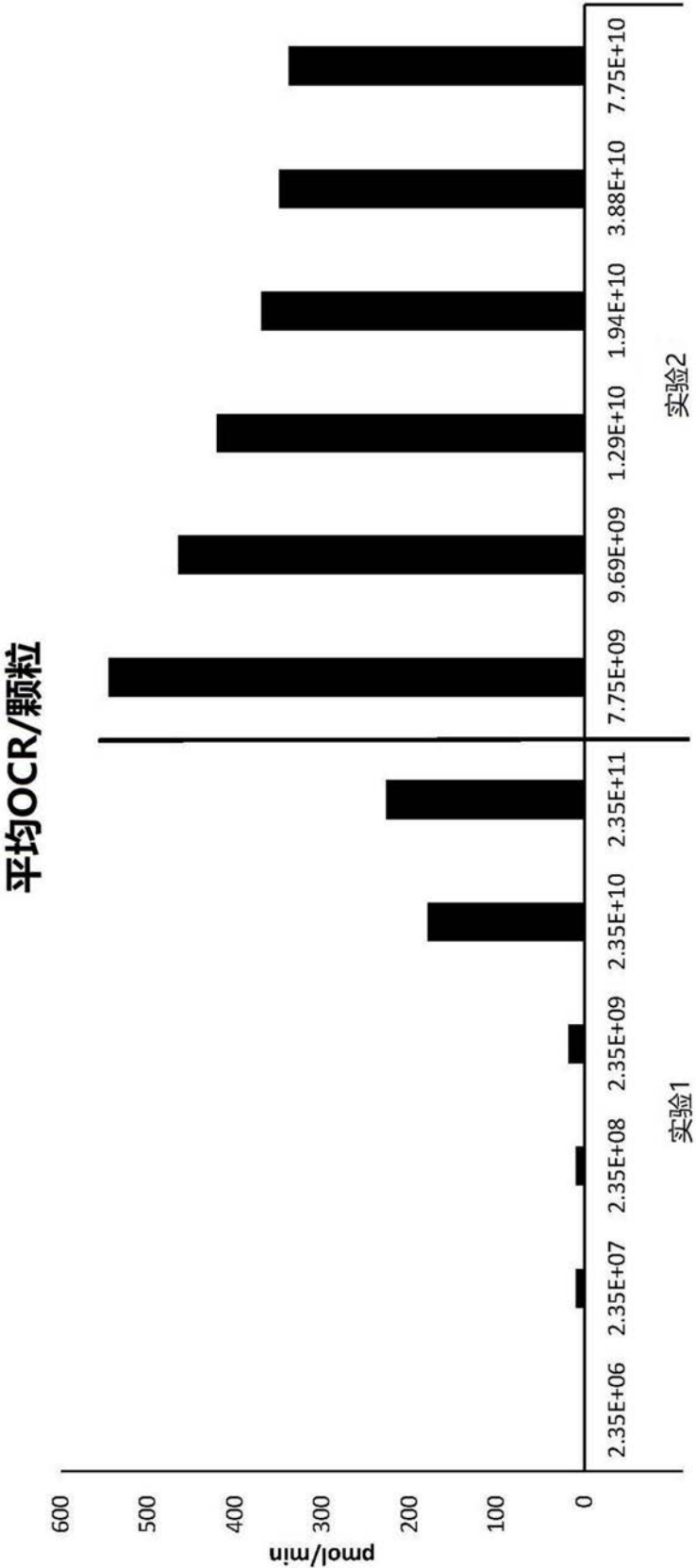


图24

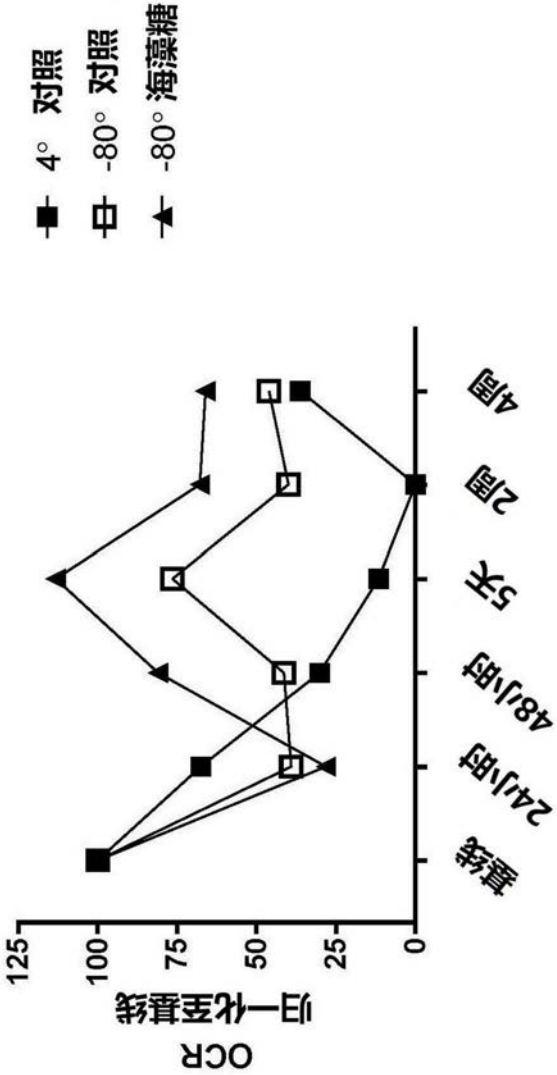


图25

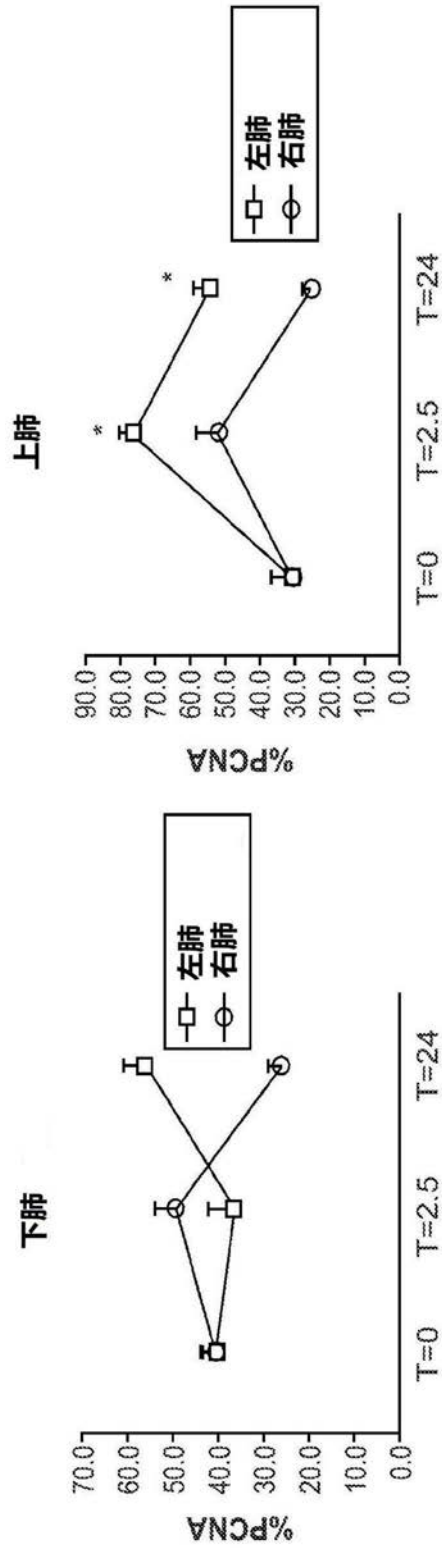


图 26B

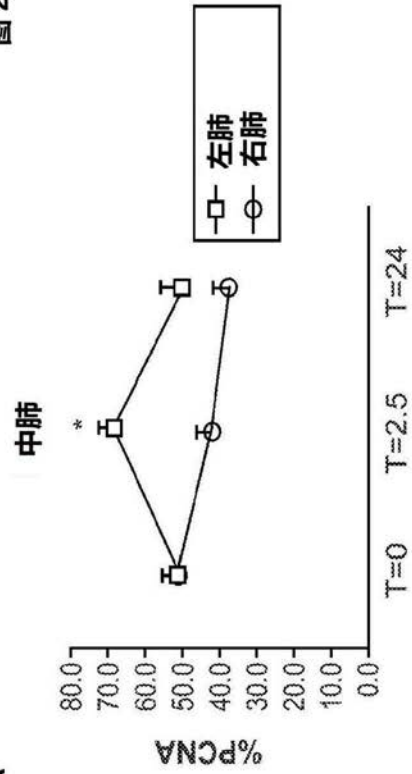


图 26C

图 26

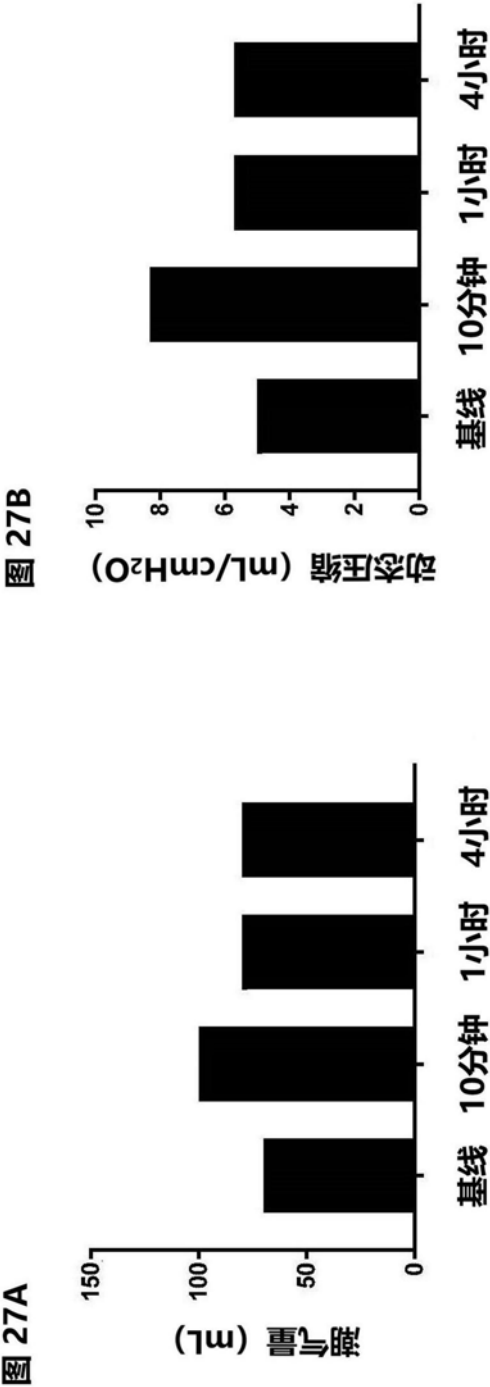


图27

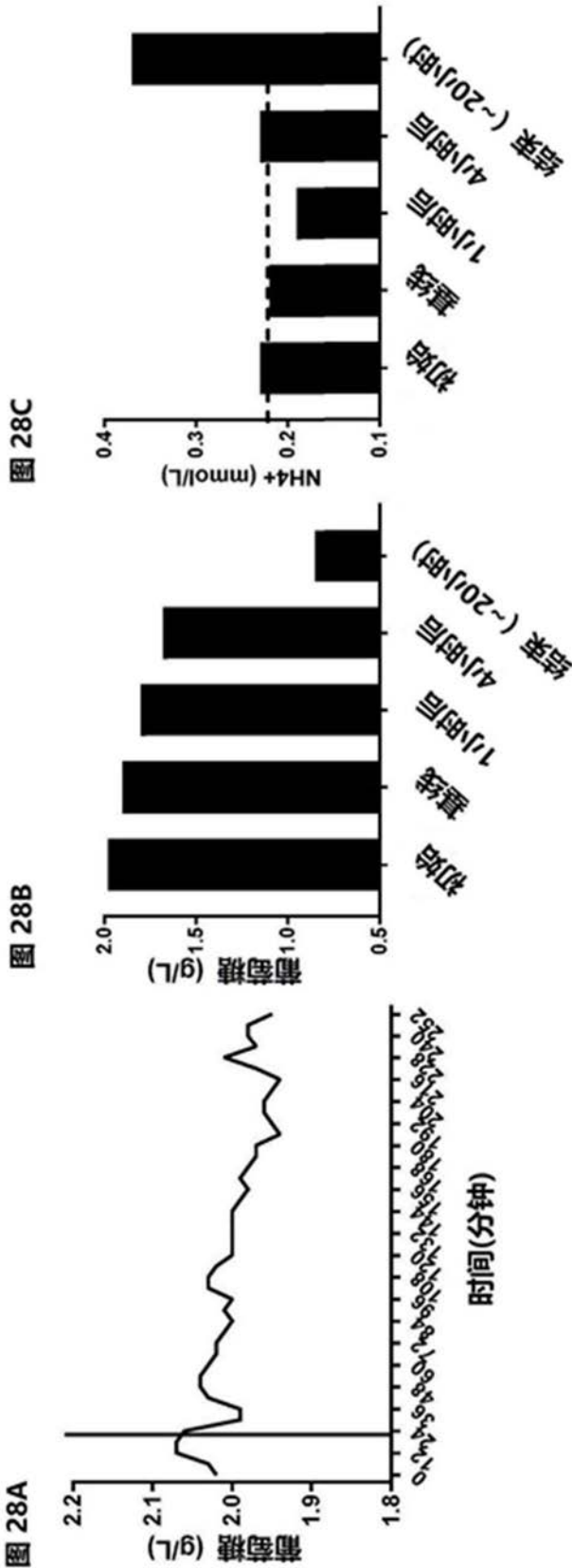


图28

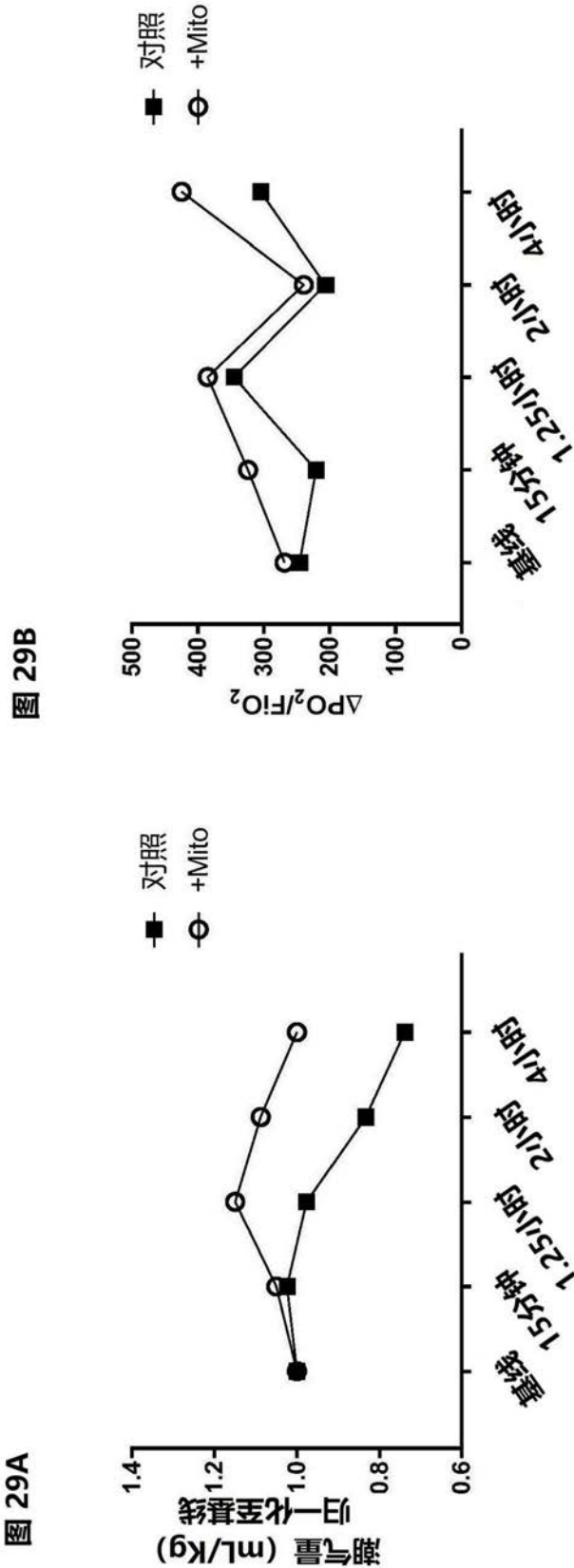


图29

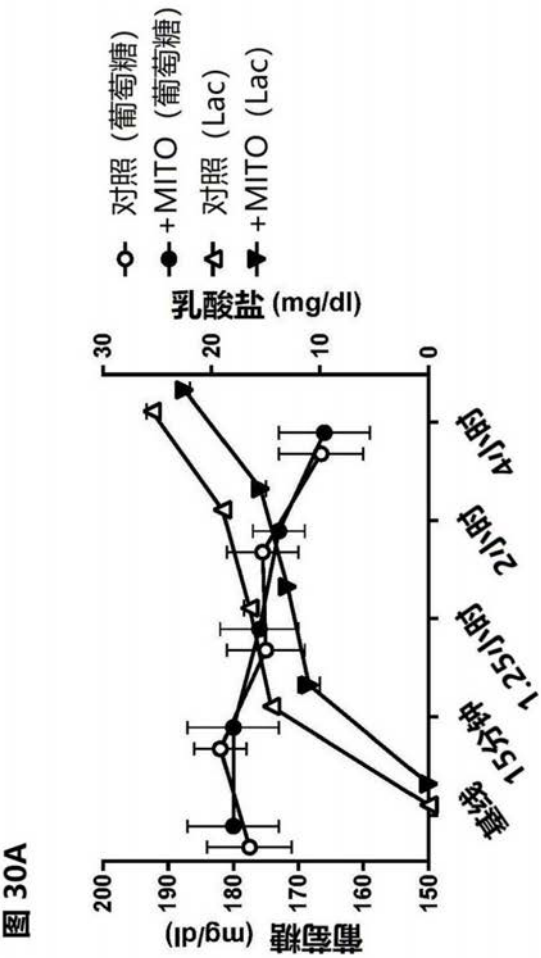
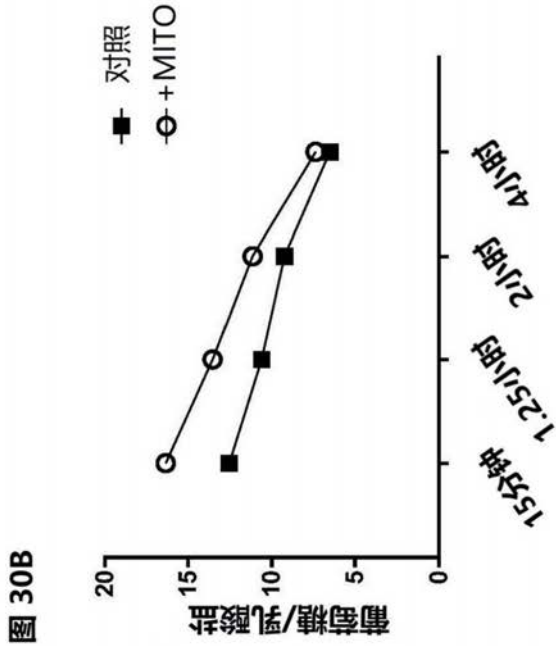


图30

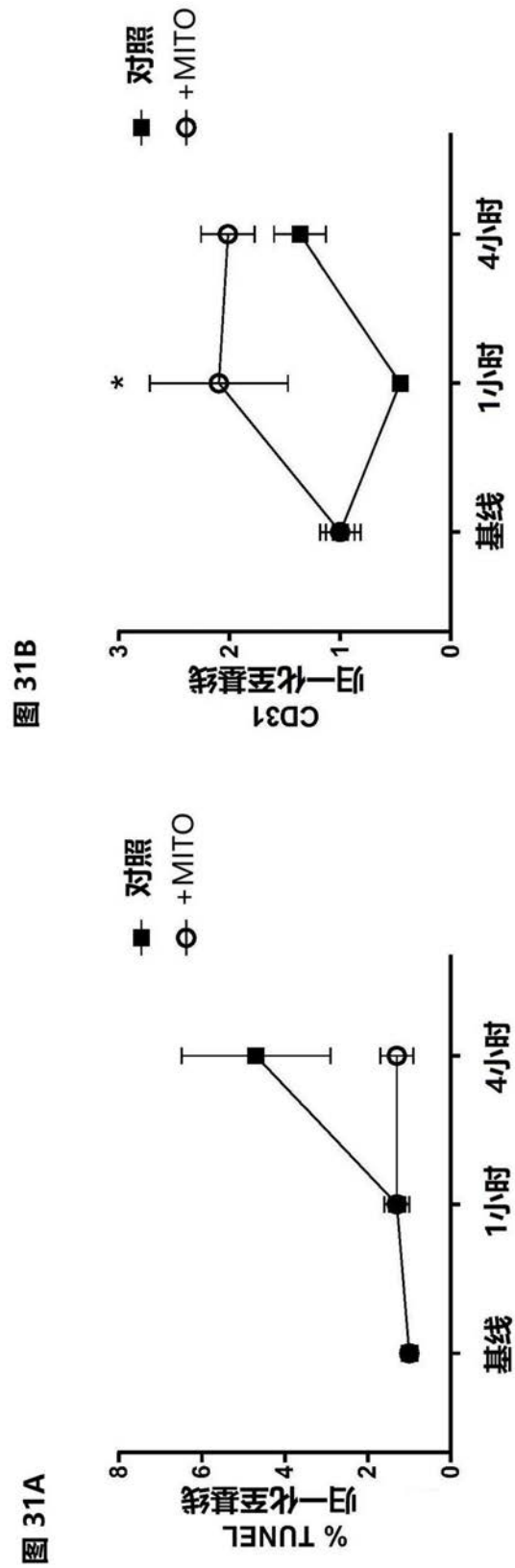


图31

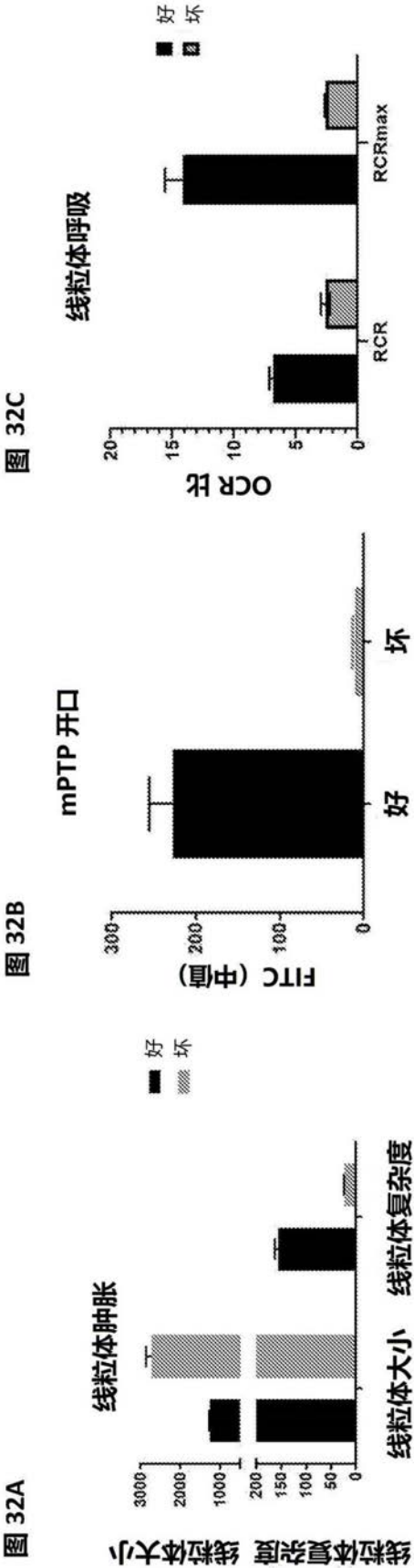


图32

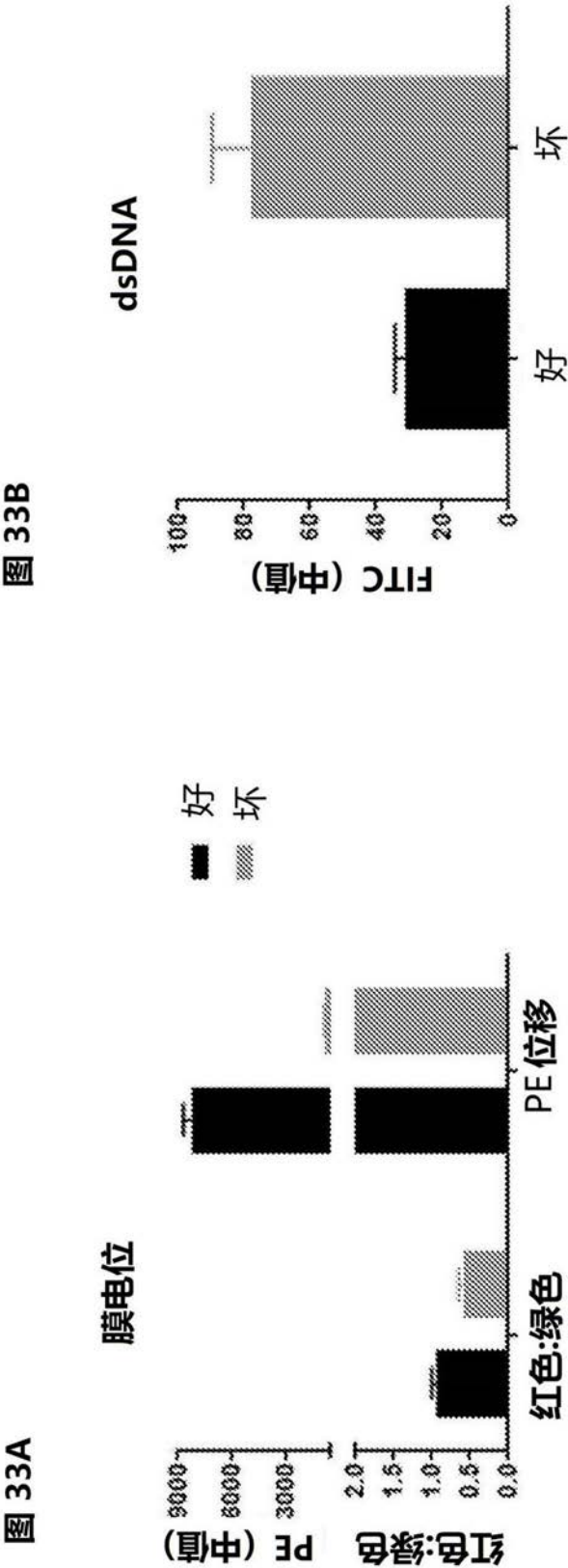


图33

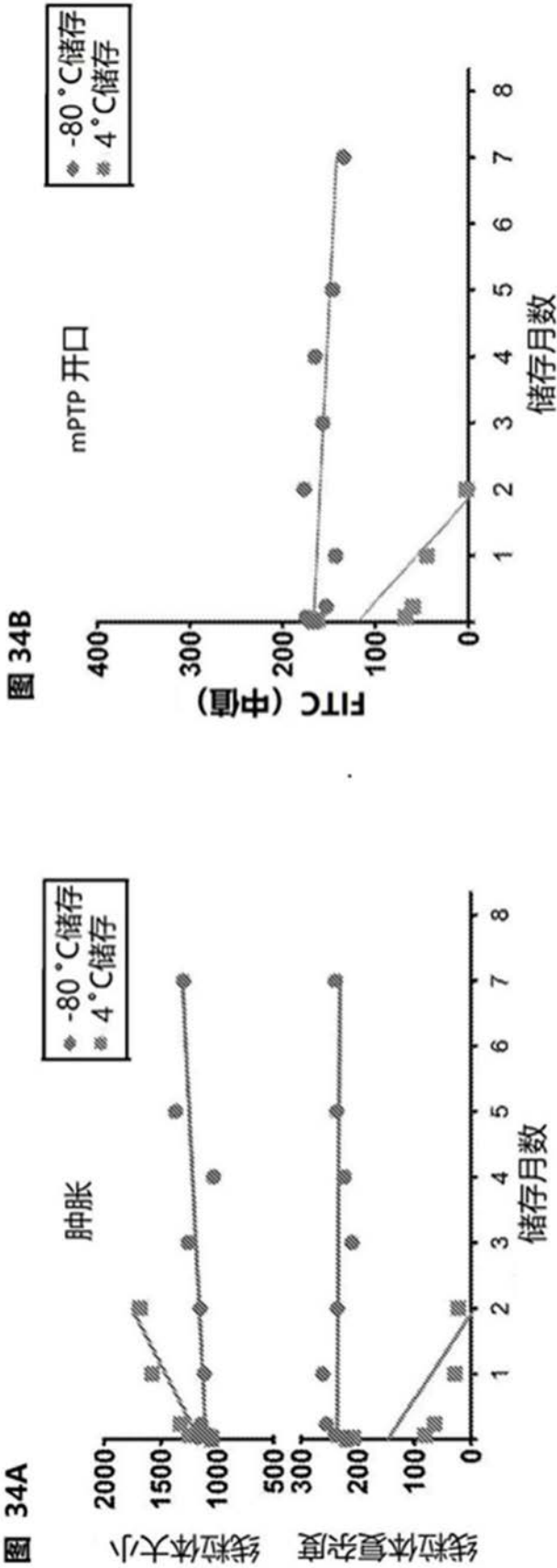


图34

图 34D

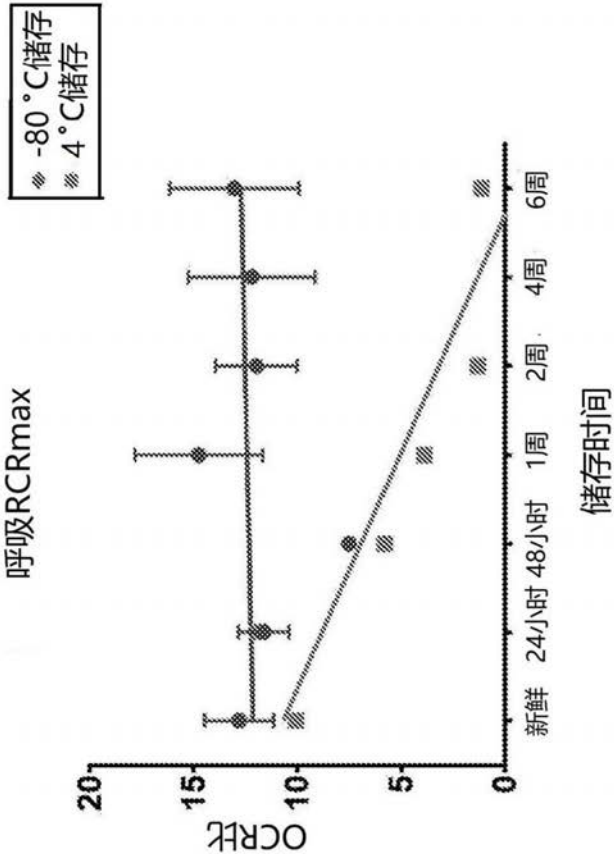


图 34C

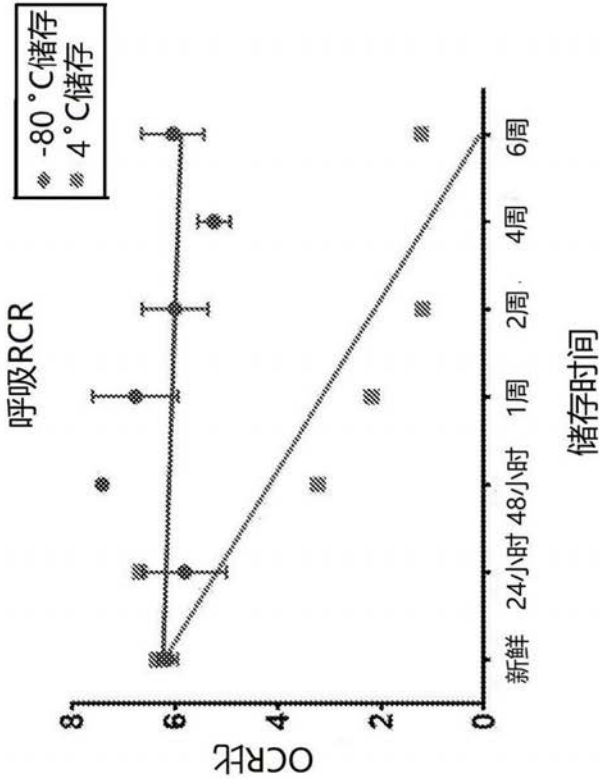


图34 (续)

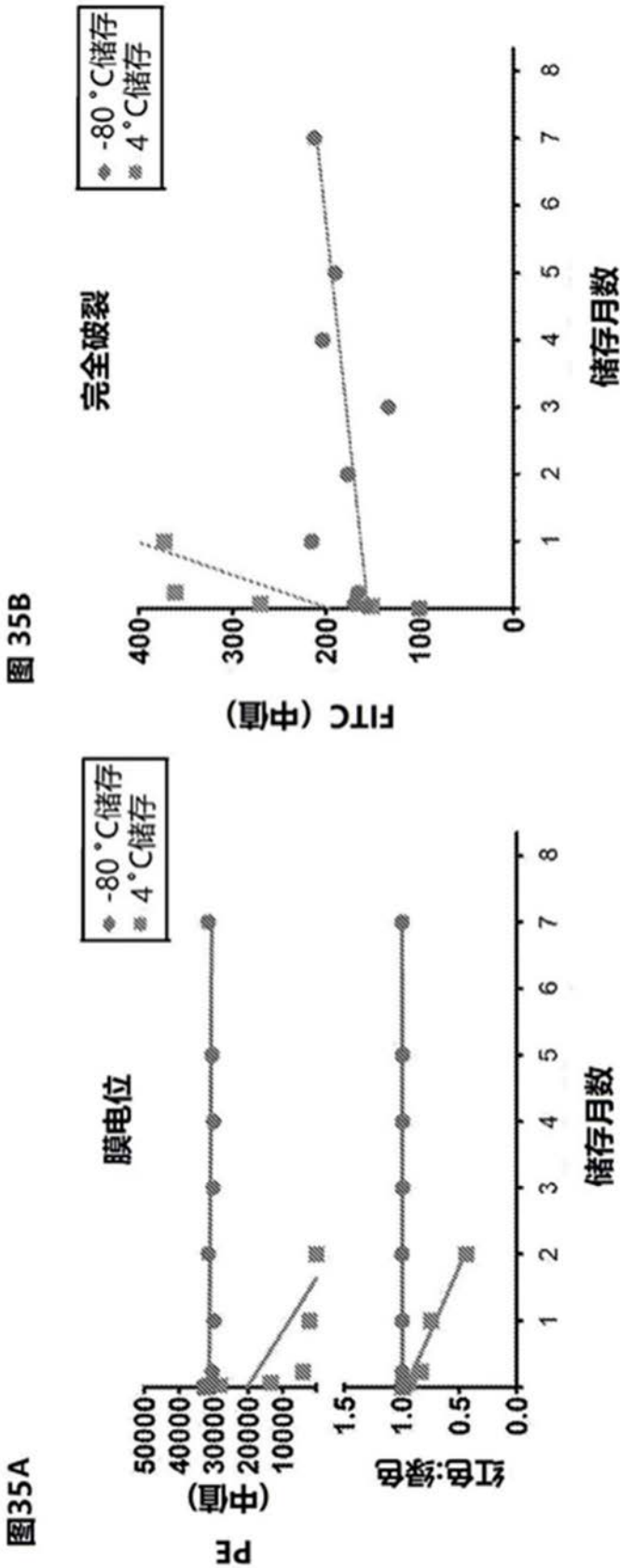


图35

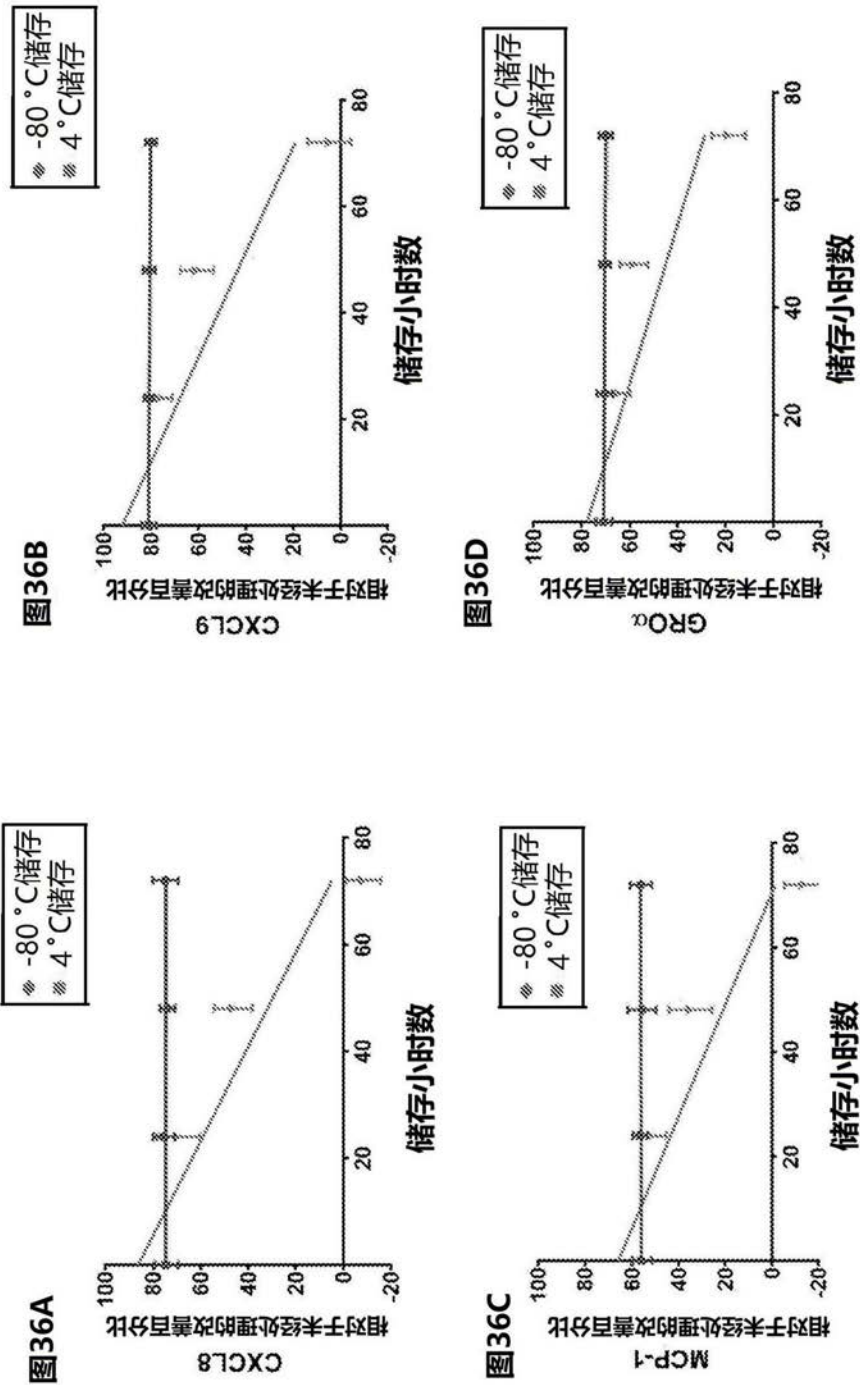


图36

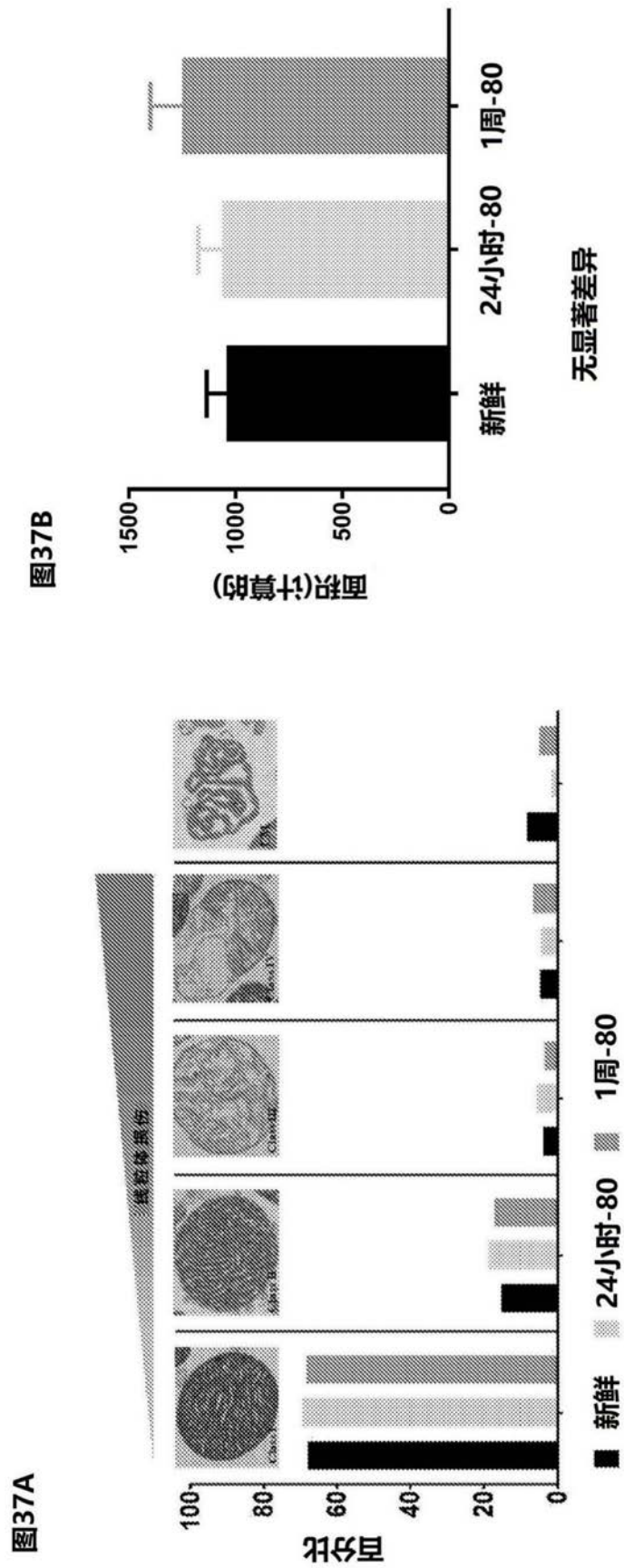


图37

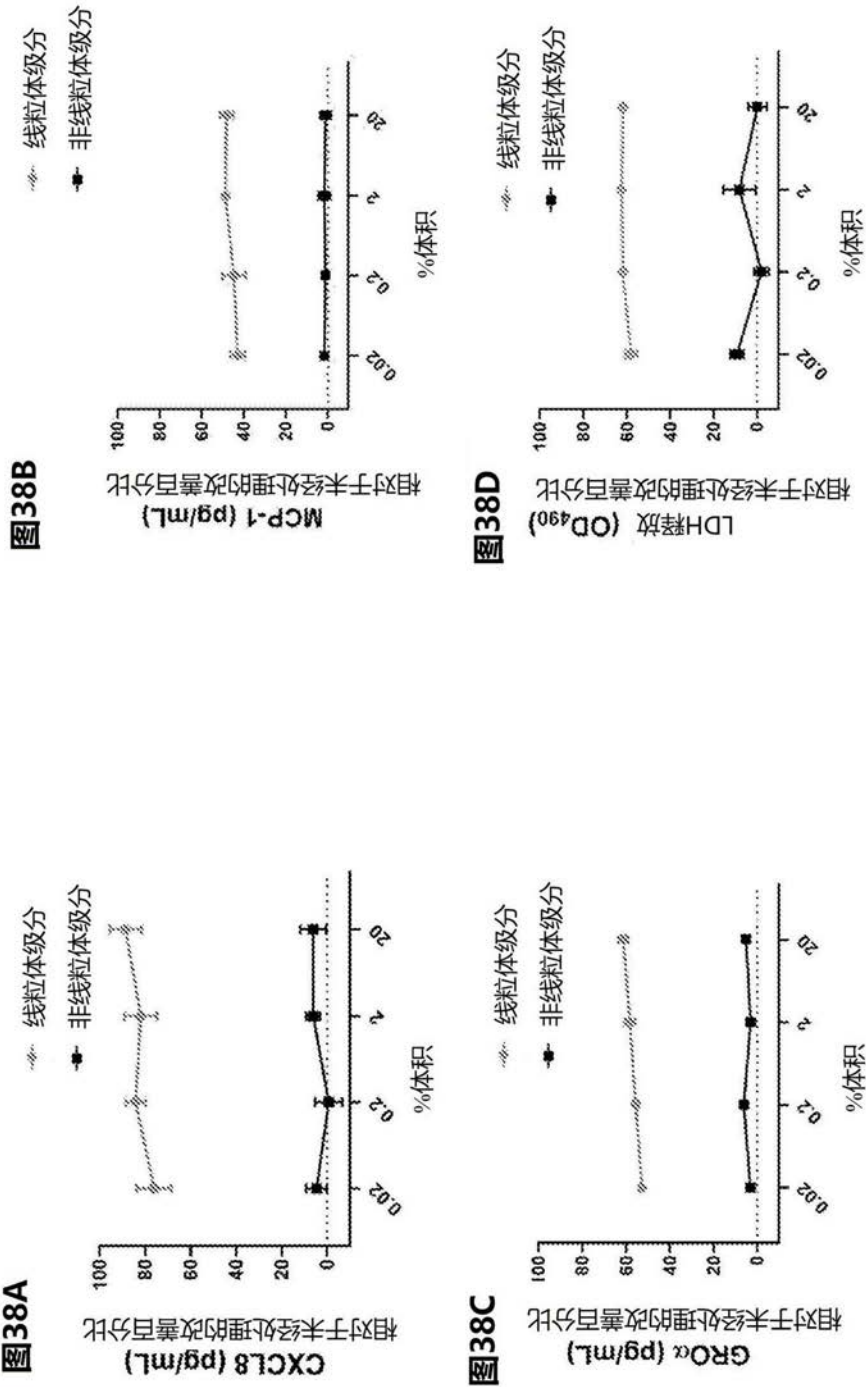


图38

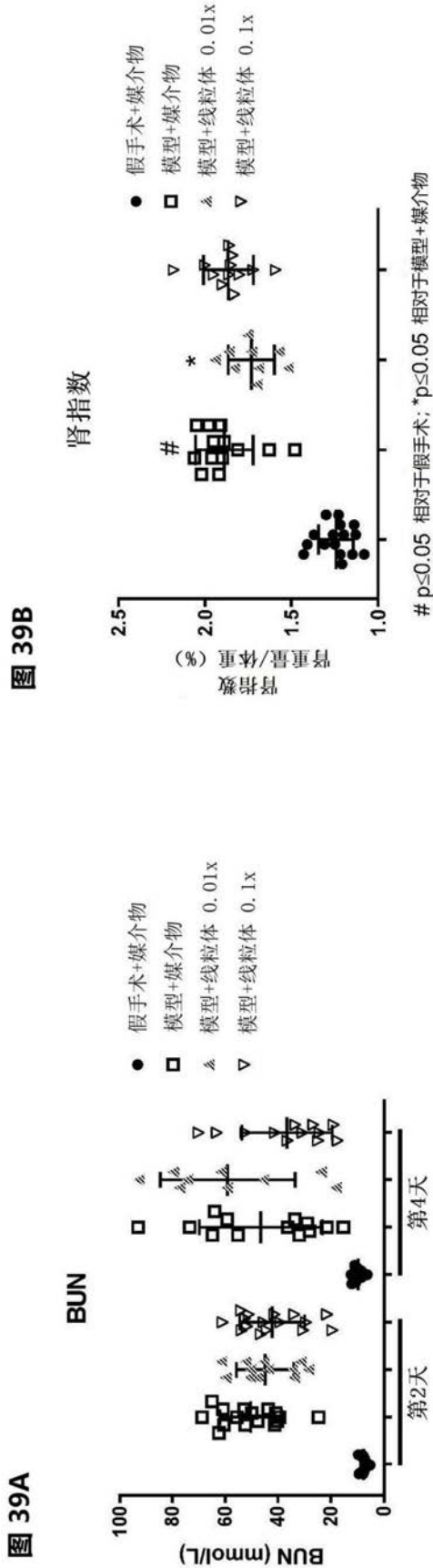


图39

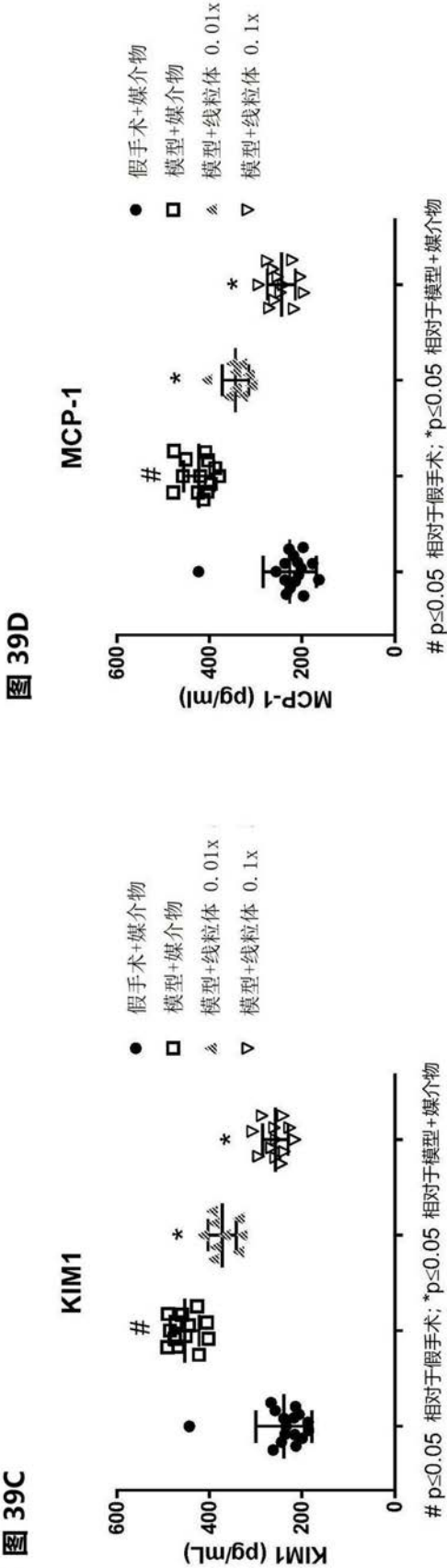


图39(续)

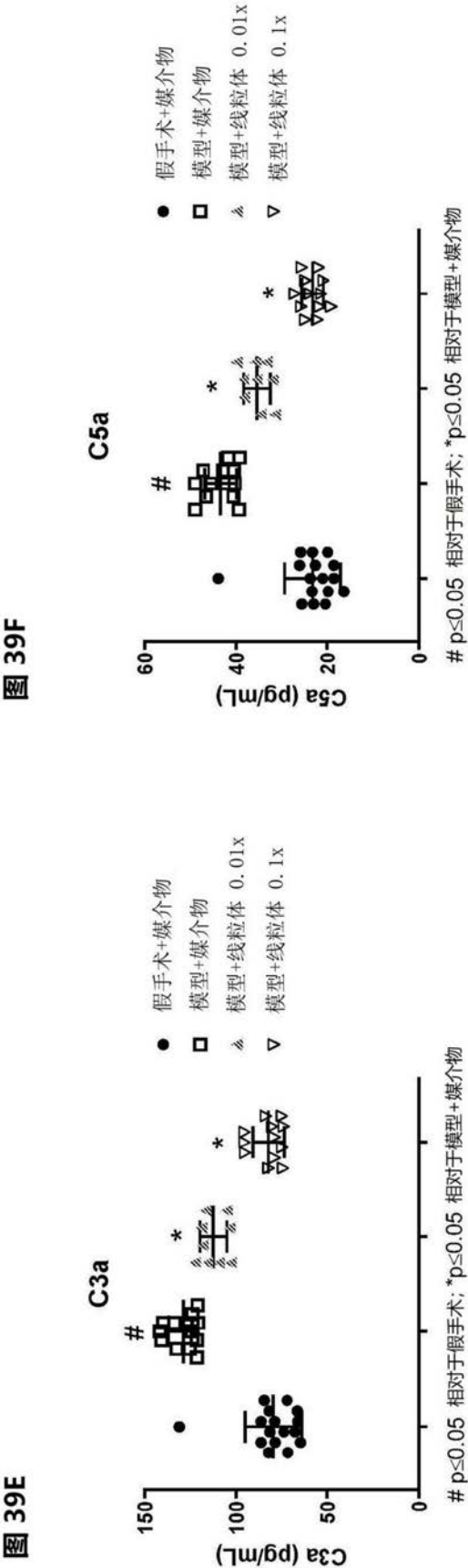


图39(续)

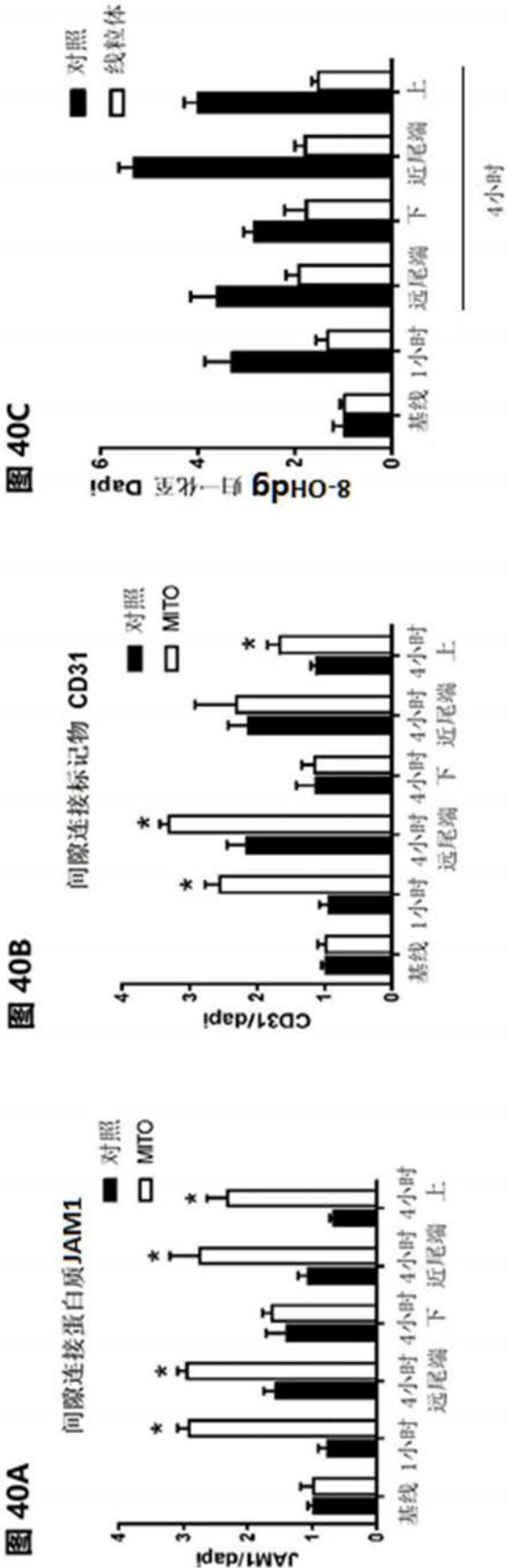


图40

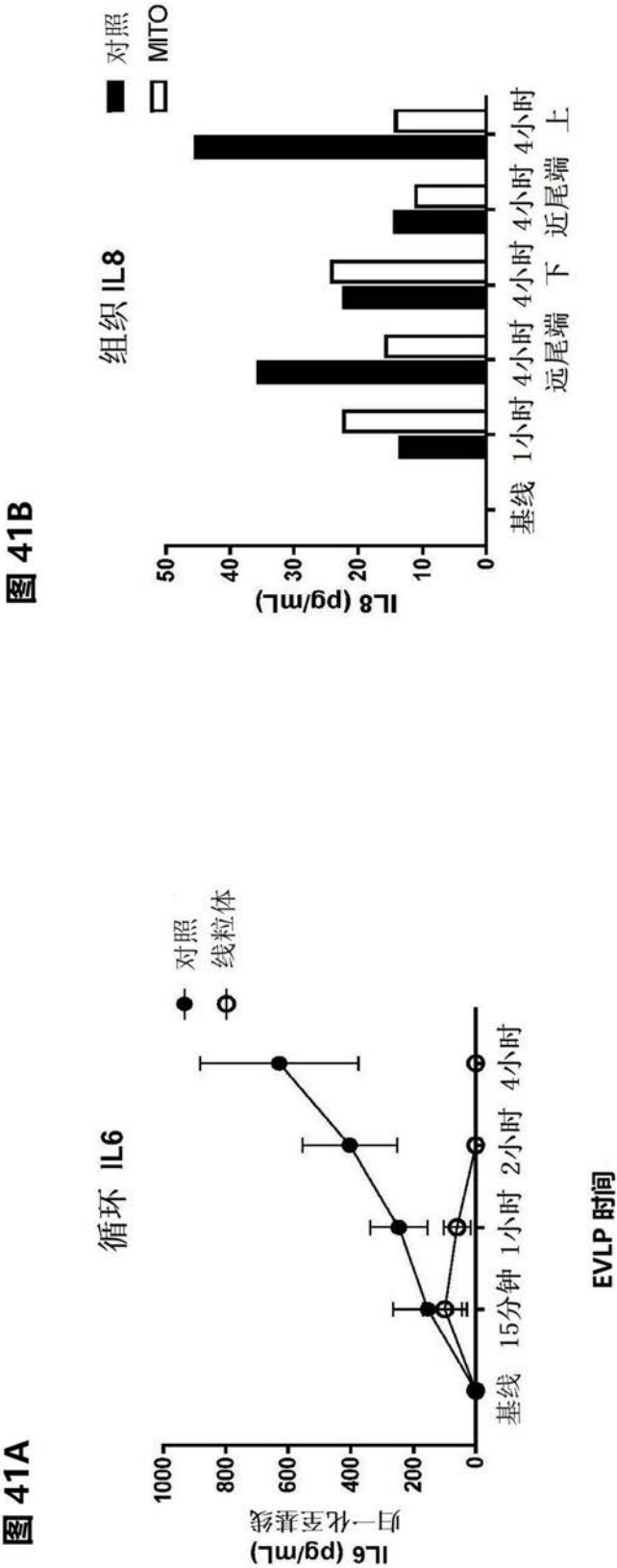


图41

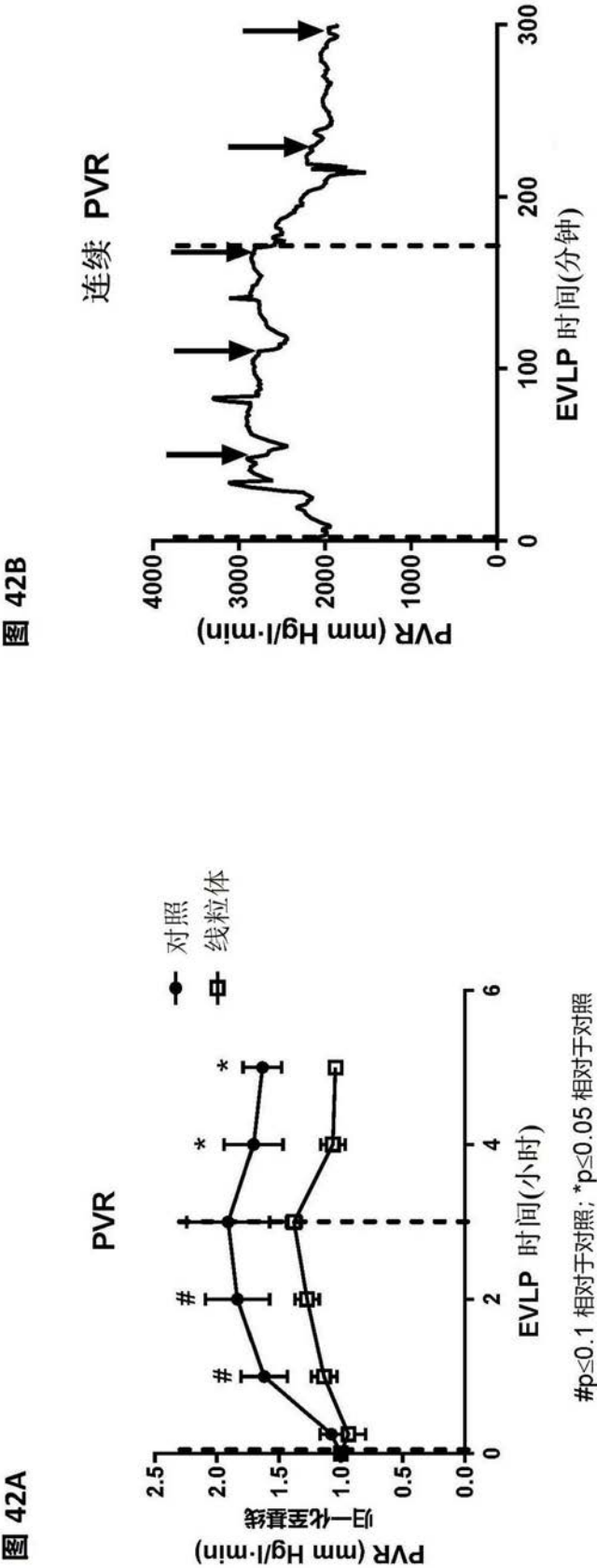


图42

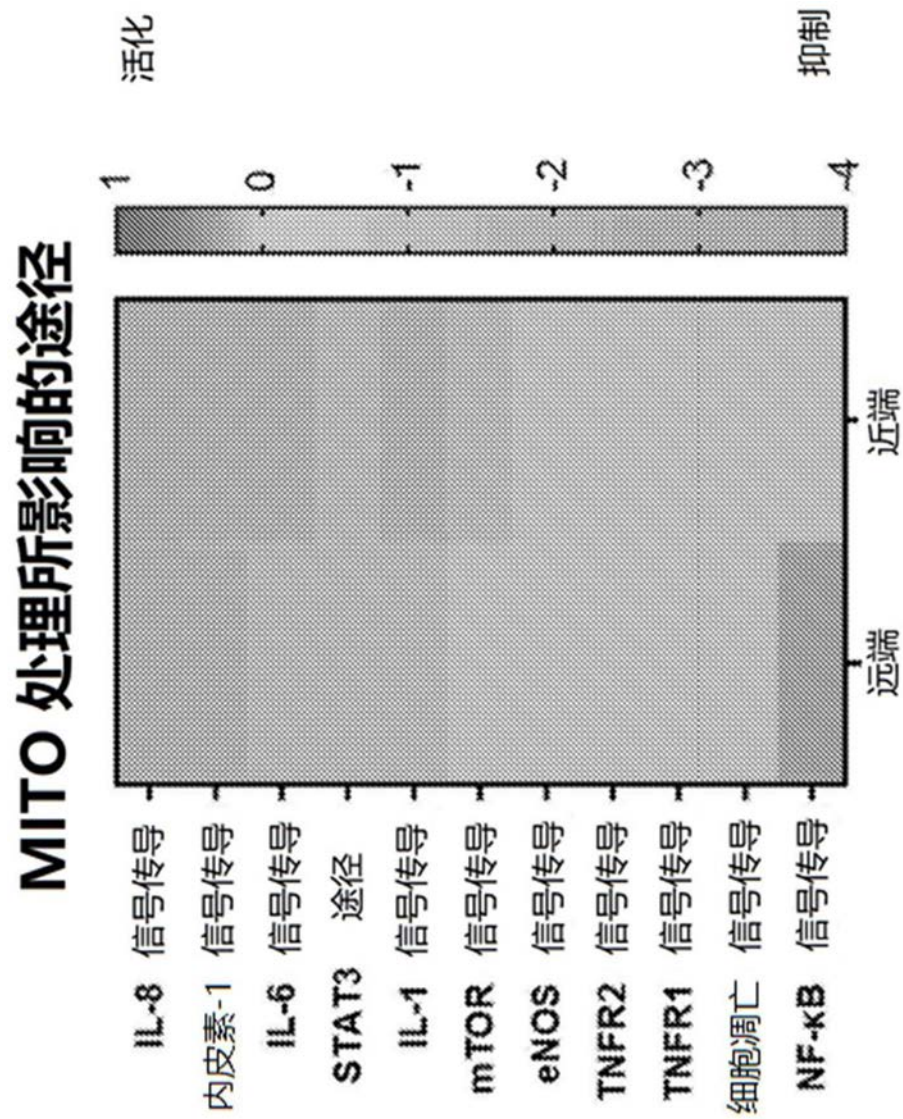


图43

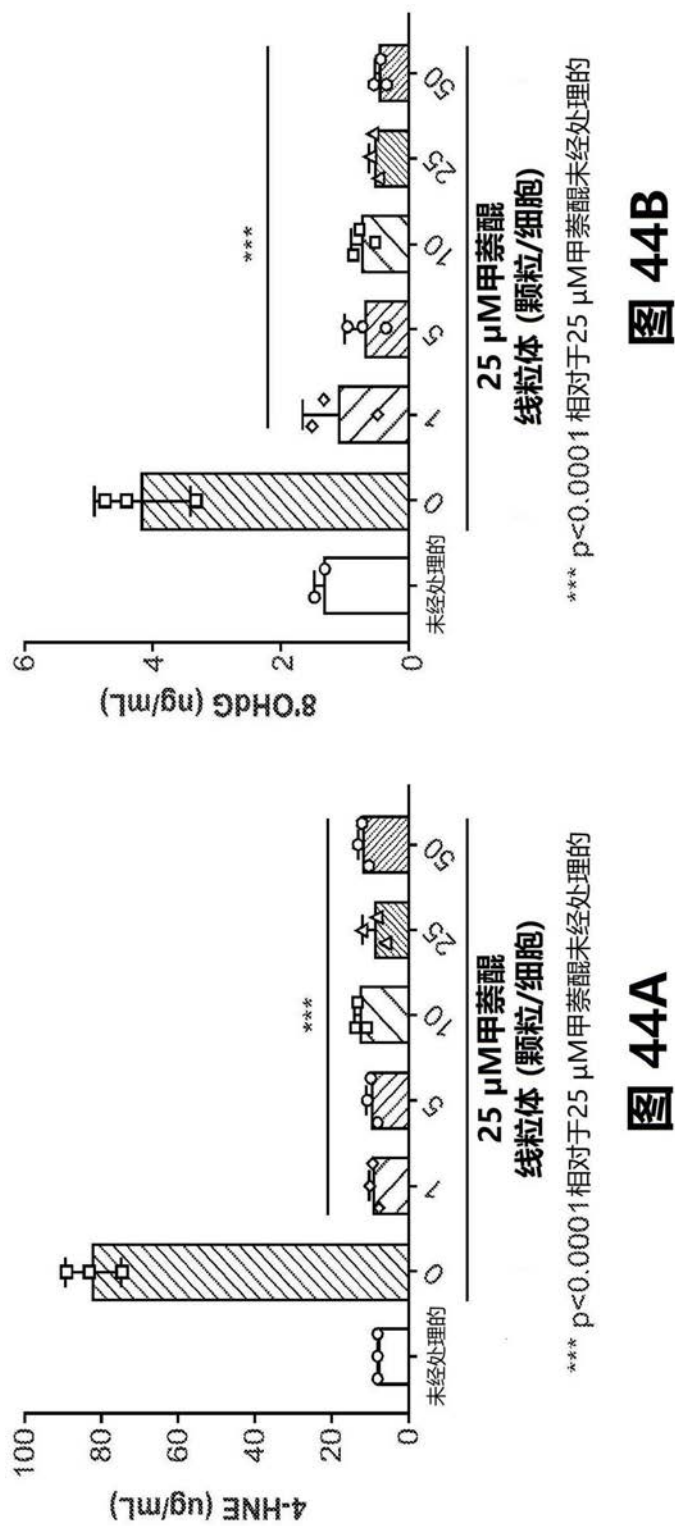


图44

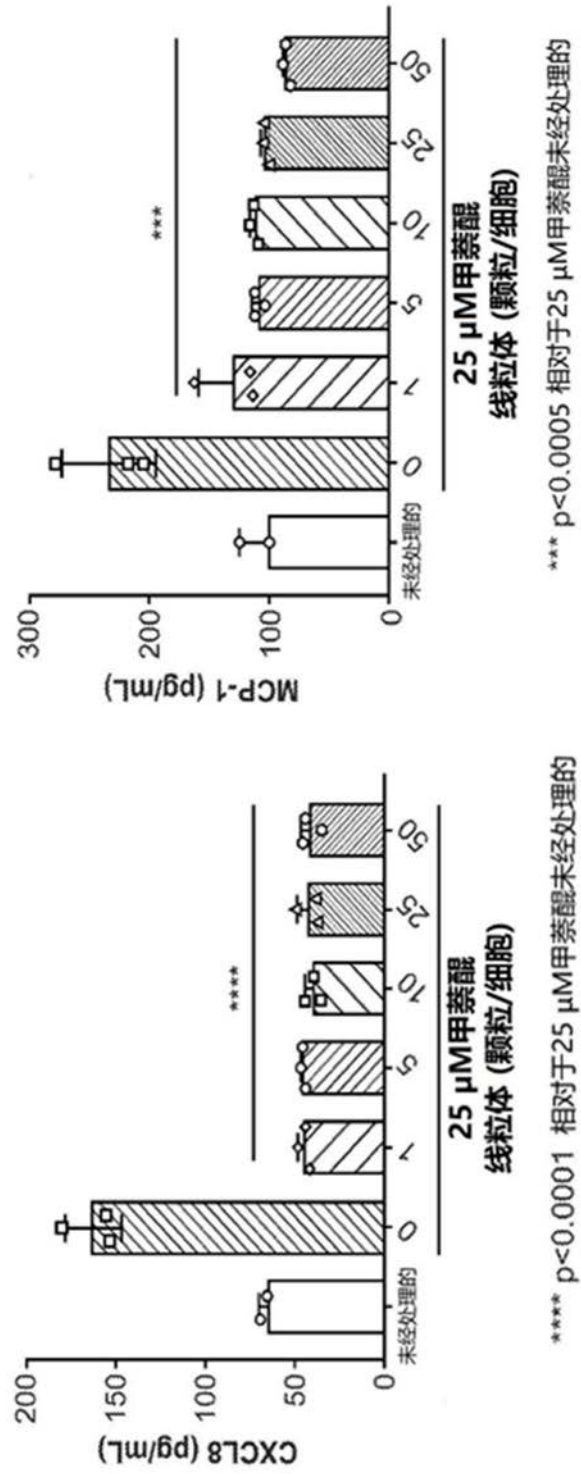


图 44C

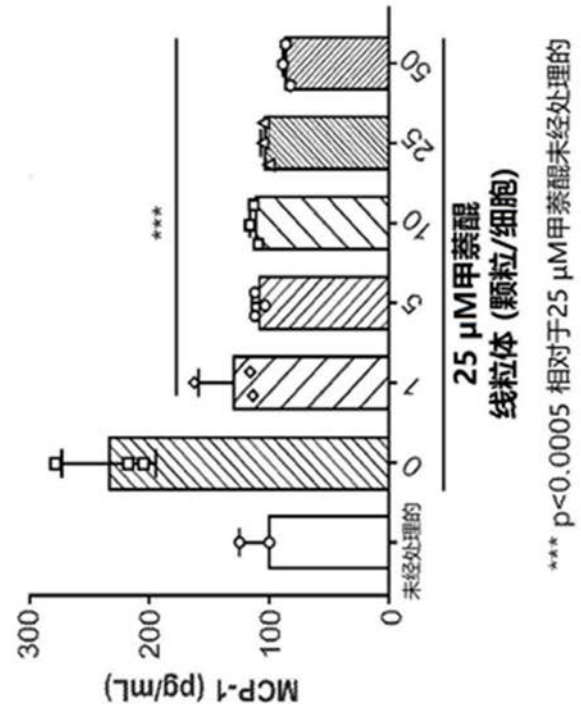


图 44D

图44 (续1)

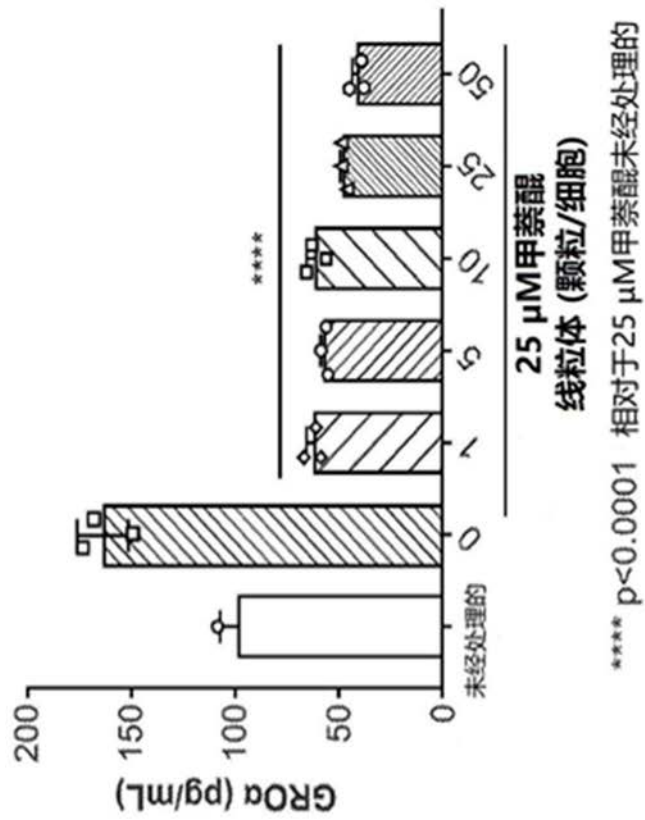


图 44F

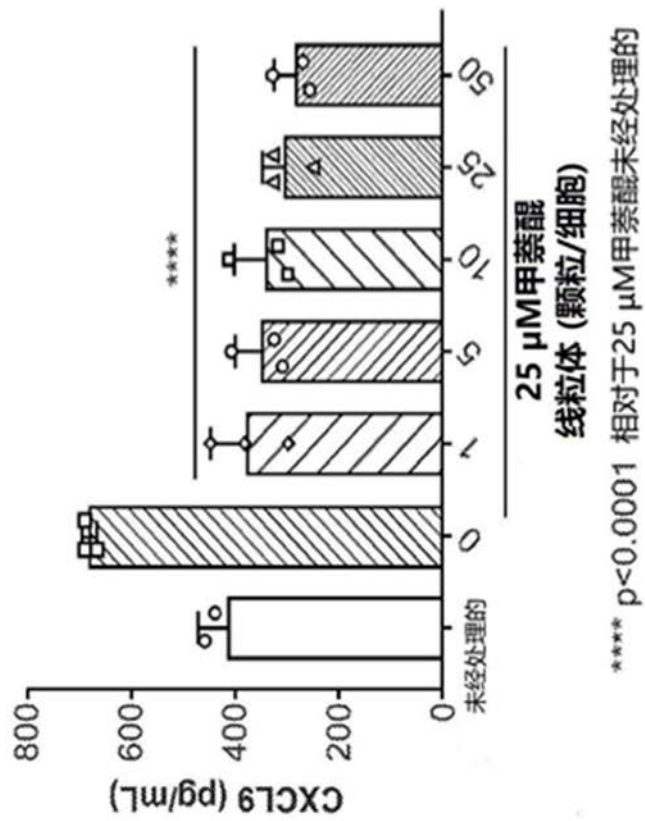


图 44E

图44 (续2)

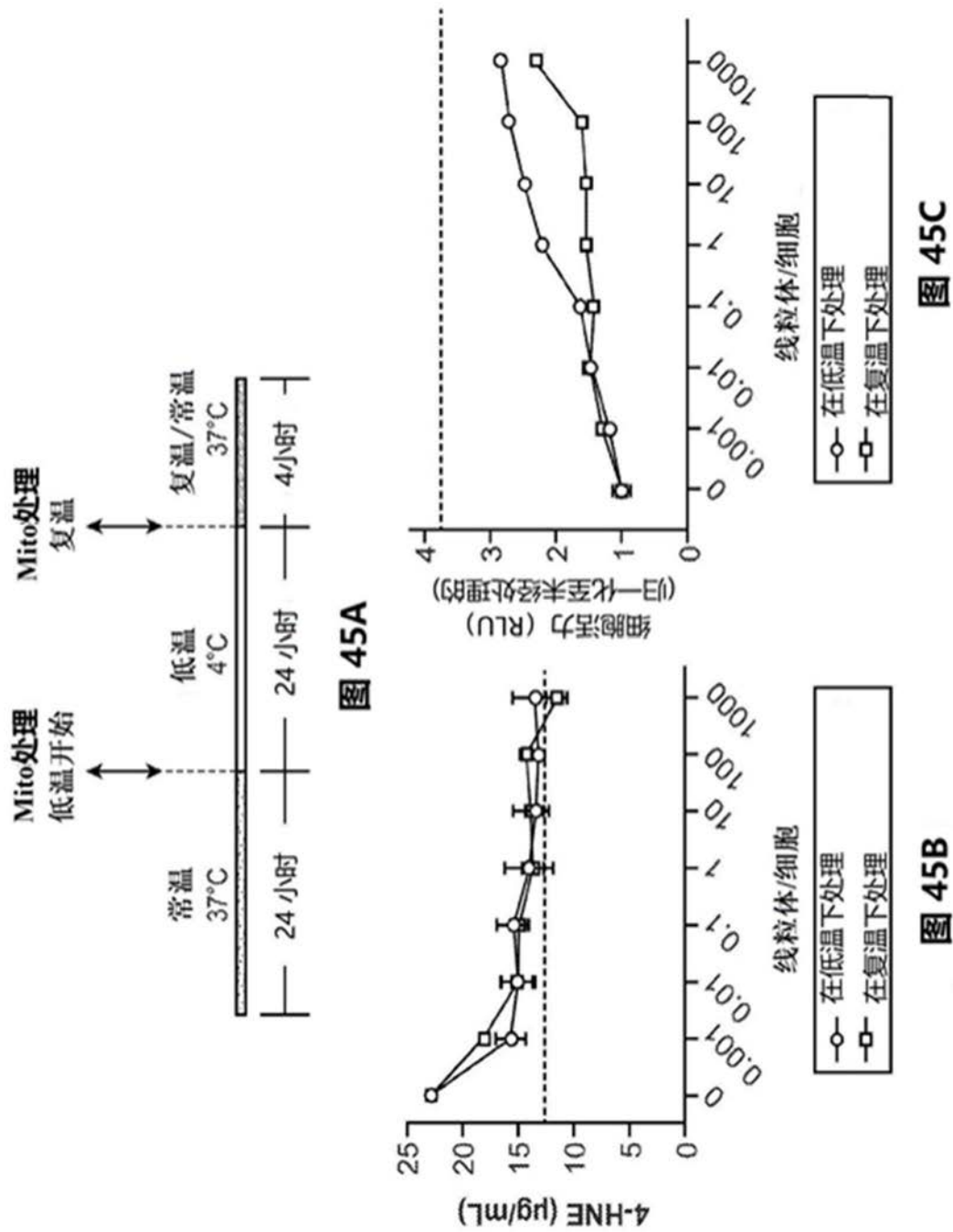


图45

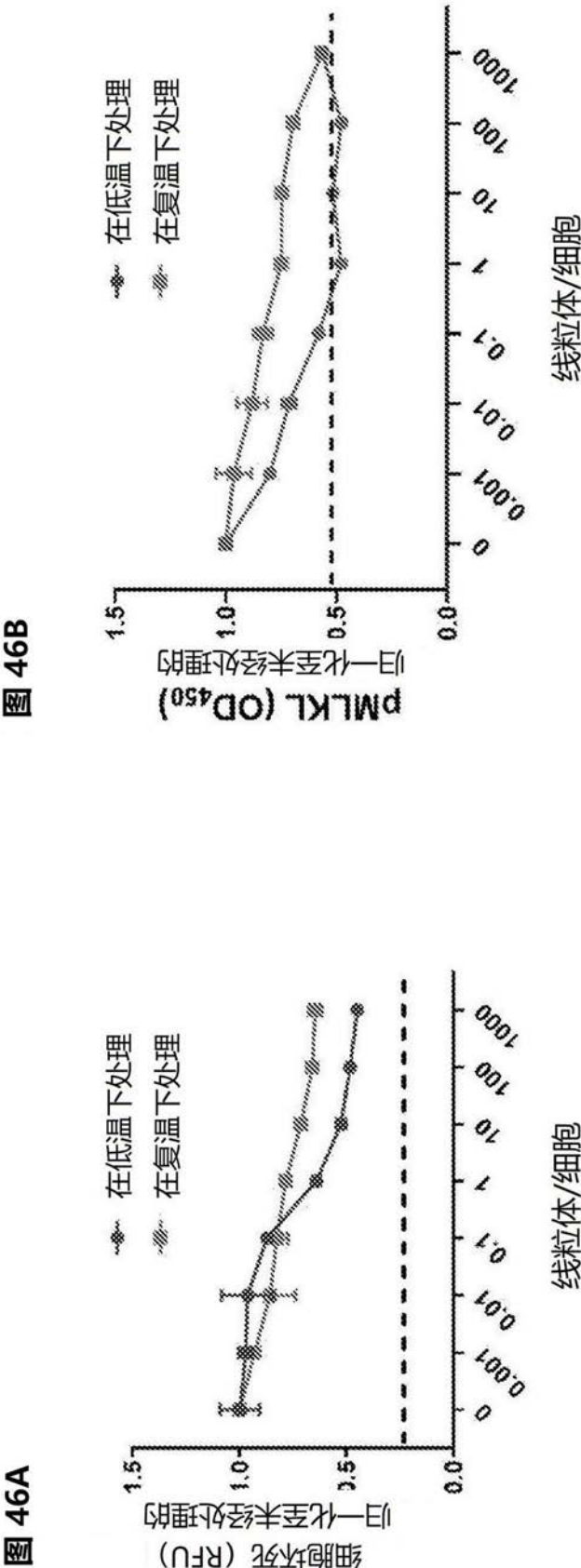


图46

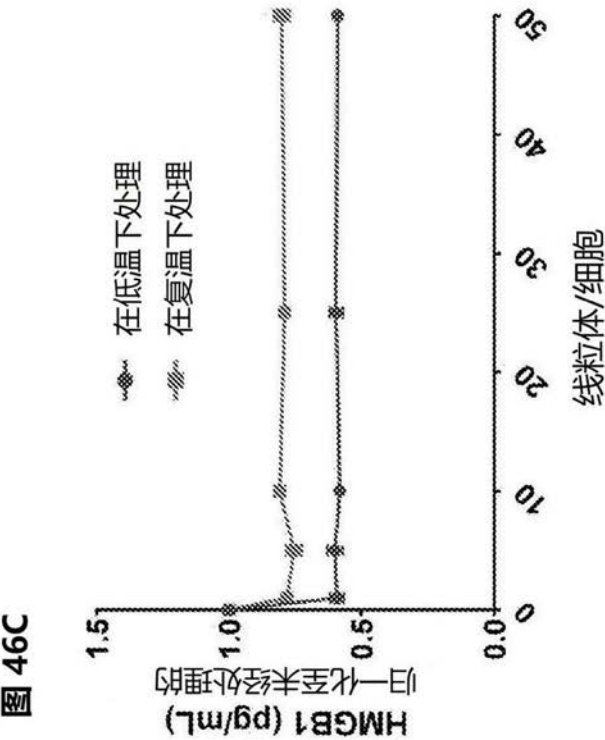
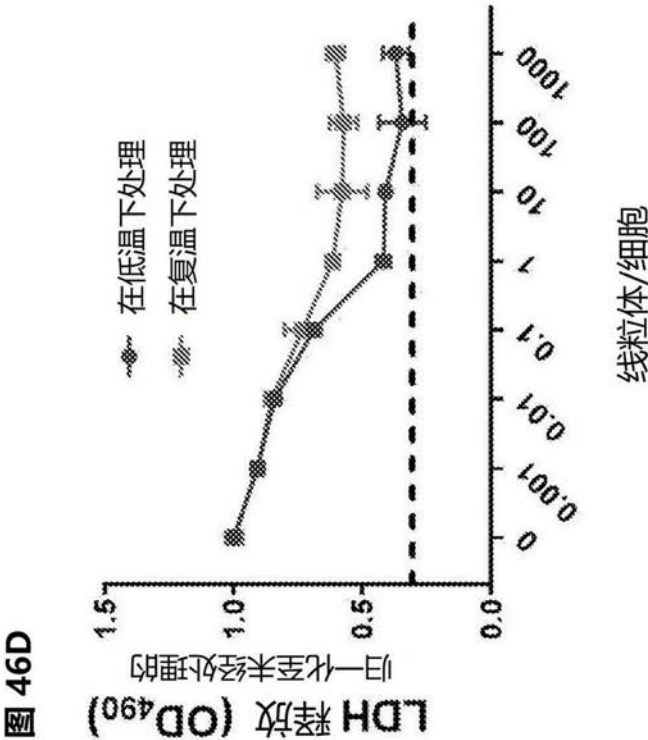


图46

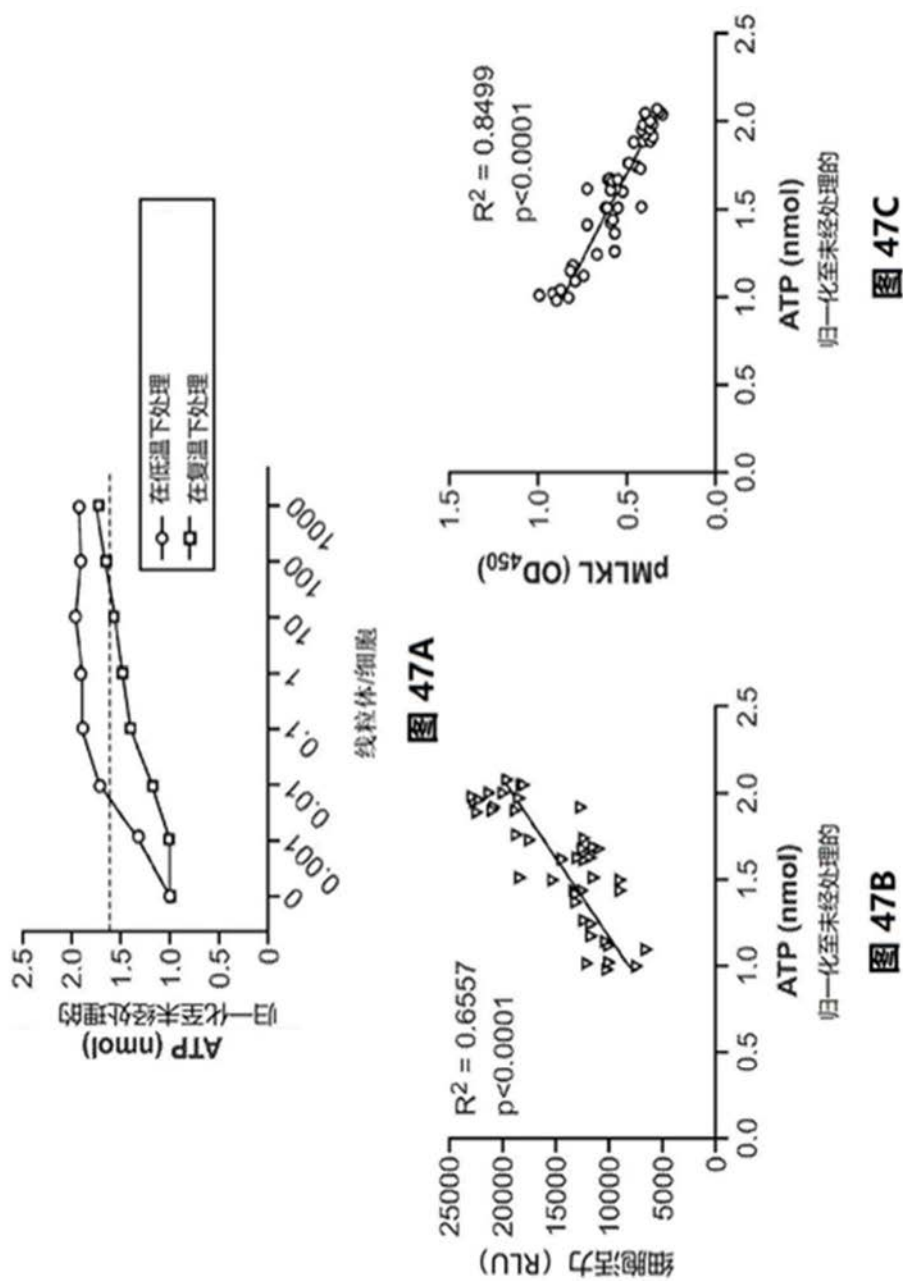


图47

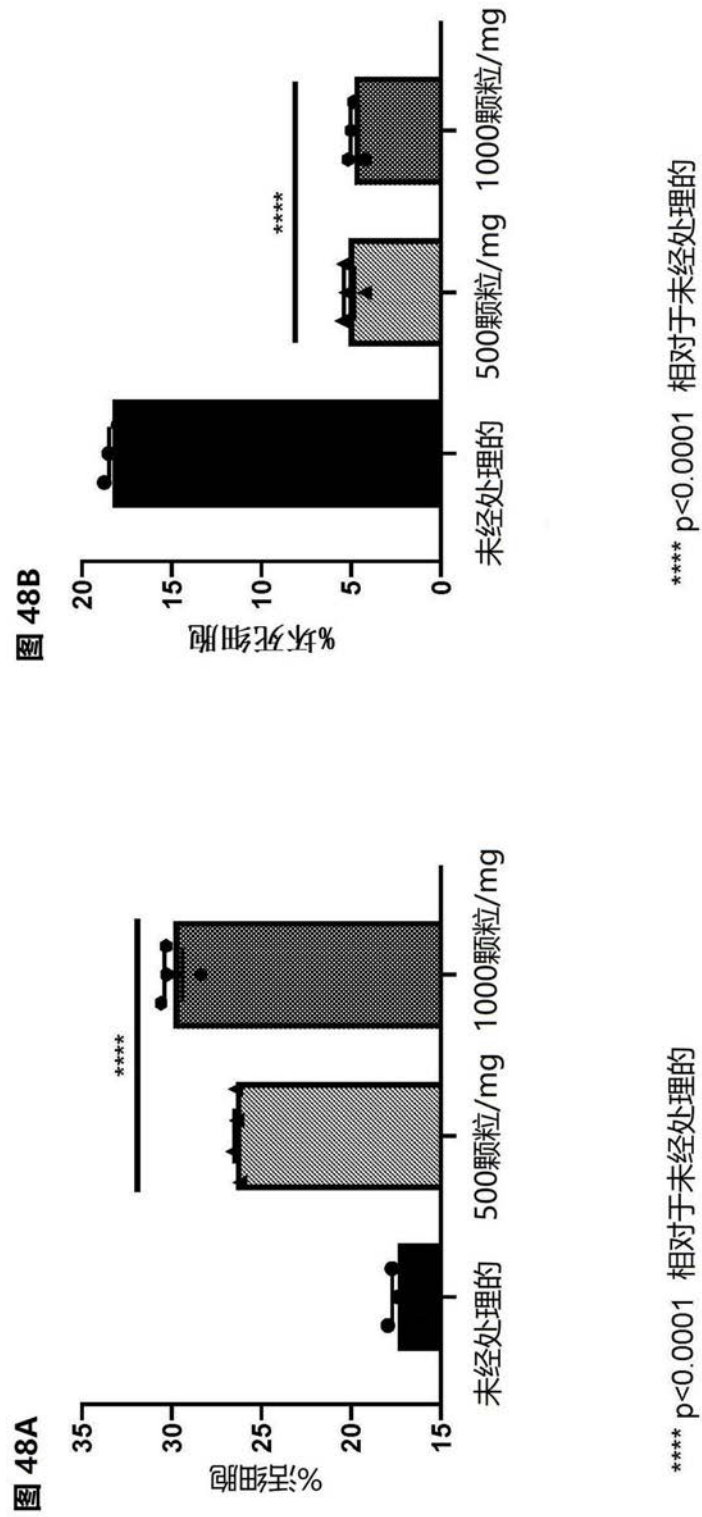


图48

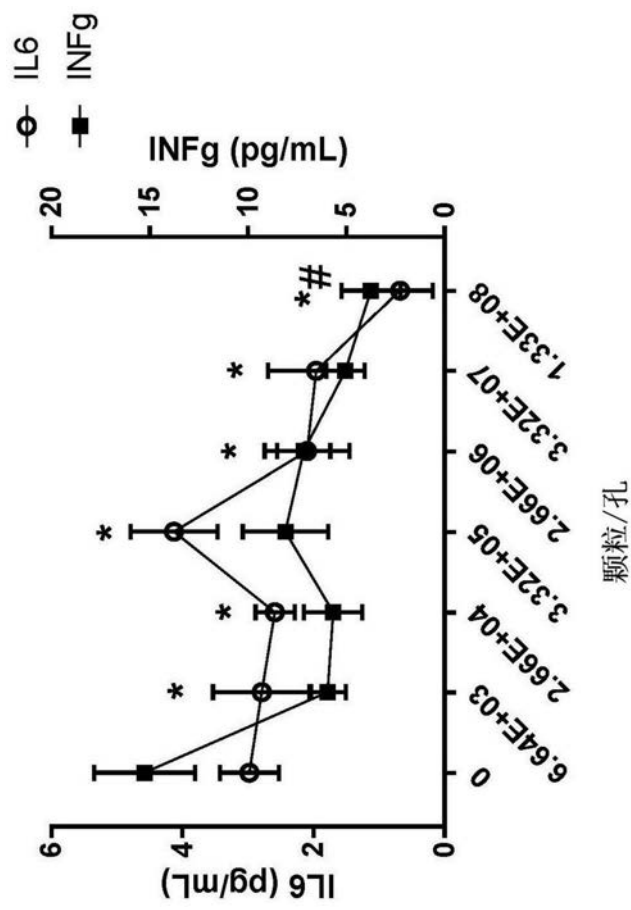


图49