(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0037435
(43) 공개일자 2022년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/36 (2006.01) *A01N 1/02* (2006.01)
A61K 35/12 (2020.01) *A61P 11/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/3683 (2013.01)
A01N 1/0226 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7000848
(22) 출원일자(국제) 2020년06월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년01월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/038133
(87) 국제공개번호 WO 2020/257281
국제공개일자 2020년12월24일
(30) 우선권주장
62/863,034 2019년06월18일 미국(US)

(71) 출원인
유나이티드 쎄러퓨틱스 코포레이션
미국, 메릴랜드, 실버 스프링, 스프링 스트리트 1040 (우:20910)
(72) 발명자
피터슨, 토마스
미국 노스캐롤라이나 27705 더럼 피치웨이 드라이브 4315
호간, 사라
미국 노스캐롤라이나 27613 롤리 굿뷰 코트 10117
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

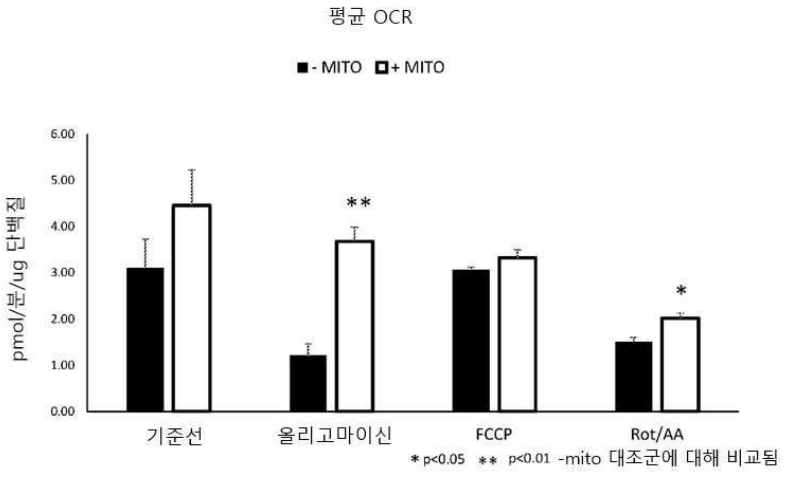
전체 청구항 수 : 총 525 항

(54) 발명의 명칭 **이식용 장기의 미토콘드리아 처리**

(57) 요 약

단리된 미토콘드리아와 관련된 방법 및 조성물이 개시된다. 예를 들어, 세포, 조직 또는 장기는 돼지 미토콘드리아와 같은 단리된 미토콘드리아로 처리되어, 세포, 조직 또는 장기에서 미토콘드리아 기능을 향상시킬 수 있다. 미토콘드리아 기능의 향상은 증가된 산소 소모 및 증가된 ATP 합성을 포함한다. 상기 방법 및 조성물은 세포 요법; 장기 및 조직 이식; 장기 및 조직 조작; 및 적출된 장기, 조직 및 세포의 저온 보관 또는 수송에 유용하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/12 (2013.01)
A61L 27/3604 (2013.01)
A61L 27/3687 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
A61L 2430/26 (2013.01)
A61L 2430/40 (2013.01)
(72) 발명자
일라간, 로저
미국 노스캐롤라이나 27705 더럼 시비어 스트리트 2517
클로어, 캐린
미국 노스캐롤라이나 27006 어드밴스 잭슨 드라이브 148

명 세 서

청구범위

청구항 1

이식용으로 의도된 장기에 단리된 미토콘드리아를 전달하는 단계를 포함하는 장기 이식 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 기증자로부터 장기를 적출(harvesting)하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 기증자로부터 장기를 적출하는 단계 전에, 단리된 미토콘드리아가 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 기증자로부터 장기를 적출하는 단계 후에, 단리된 미토콘드리아가 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기를 피이식자에게 이식하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 피이식자에 대해 동종이계(allogeneic)의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 피이식자에 대해 자가유래(autologous)의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이식용으로 의도된 장기가 인간 기증자로부터 적출되는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 인간 기증자에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 인간 기증자에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 이식용으로 의도된 장기가 돼지 장기 스캐폴드로부터 조작되는 것인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제5항, 제8항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기의 세포가, 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 합성인 것인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 장기가 폐인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 폐 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자에게 이식되는 것인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 폐 질환 또는 장애가 폐 고혈압, 기관지폐형성이상(bronchopulmonary dysplasia, BPD), 폐 섬유증, 천식, 수면호흡장애 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)인 것인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, 만성 혈전색전성 폐 고혈압(CTEPH), 폐동맥고혈압(PAH), 폐 정맥 폐쇄증(PVOD), 폐 모세혈관 혈관종증(PCH), 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압(pulmonary hypertension secondary to left heart disease), 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압, 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 가진 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 장기가 신장인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 신장이 신장 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자에게 이식되는 것인, 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 24

조직 또는 장기의 주입 또는 이식 전, 도중 또는 그 후, 조직 또는 장기에 단리된 미토콘드리아를 전달하는 단계로서, 여기서 조직 또는 장기가 기증자 조직, 기증자 장기, 조작된 조직 또는 조작된 장기인 것인 단계

를 포함하는, 대상체에서 주입된 조직 또는 이식된 장기의 성능을 향상시키는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조직 또는 장기에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조직 또는 장기에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조직 또는 장기의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조직 또는 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 합성인 것인, 방법.

청구항 30

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 조직 또는 장기가 혈관, 요관, 기관 및 피부 패치(skin patch)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 32

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 장기가 폐인 것인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 34

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 장기가 신장인 것인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 36

제24항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 조직 또는 장기가 바이오프린팅에 의해 생성되는 것인, 방법.

청구항 37

(i) 단리된 미토콘드리아를 폐에 전달하는 단계, 및

(ii) 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기 내에서 폐에 생체외 폐 관류(EVLP)를 수행하는 단계

를 포함하는, 생체외 폐 관류를 받는 폐의 기능을 향상시키는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상된 안정성 또는 유지성(maintenance)을 갖는 것인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 폐 동맥압(PAP), 일회 호흡량(TV), 동적 유순도(dynamic compliance), 폐 혈관 저항(PVR), 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 45

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상이 향상된 PAP, 향상된 TV, 향상된 동적 유순도, 증가된 포도당/락토스 비율, 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량, 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성, 감소된 PVR , 감소된 락테이트 생성, 감소된 암모늄 생성, 향상된 분당 환기량, 향상된 혈류량, 감소된 폐 부종, 향상된 폐 탄력성, 향상된 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 47

제37항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 활성산소종(reactive-oxygen species, ROS)-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 간극 연접 마커가 연접 부착 분자 1(junctional adhesion molecule 1, JAM1) 및 CD31을 포함하는 것인, 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 인터페론-감마(IFN-γ)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 50

제47항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-하이드록시노네날(4-HNE) 및 8-하이드록시데옥시구아노신(8-OHdG)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 51

제47항에 있어서, ROS-매개 케모카인이 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함하는 것인, 방법.

청구항 52

제37항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, EVLP를 수행하기 전에, 기증자로부터 폐를 적출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, EVLP를 수행한 후에, 폐를 피이식자로 이식하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 피이식자가 폐 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자인 것인, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 폐 질환 또는 장애가 폐 고혈압, 기관지폐형성이상(BPD), 폐 섬유증, 천식, 수면호흡장애 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)인 것인, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, 만성 혈전색전성 폐 고혈압(CTEPH), 폐동맥고혈압(PAH), 폐 정맥 폐쇄증(PVOD), 폐 모세혈관 혈관종증(PCH), 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 57

제37항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도를 통해 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 58

제37항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 저장소로부터 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 59

제37항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 60

제37항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행하기 전에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 61

제37항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행하는 동안 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 62

제37항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행한 후에 폐에 전달되는 것인,

방법.

청구항 63

제52항 또는 제53항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 전에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 64

제52항 또는 제53항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 후에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 66

제37항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 용액이 스틴 용액(Steen solution), 퍼파덱스(Perfadex), 저 칼륨 덱스트란 용액, 전혈, 희석 혈액, 패키징된 적혈구(RBC), 대용 혈장제, 하나 이상의 혈관확장제, 중탄산나트륨, 포도당 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 67

제37항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 용액이 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 폐로 도입되는 것인, 방법.

청구항 68

제37항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 폐가 챔버 또는 용기에서 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 환기되는 것인, 방법.

청구항 69

저온 허혈 0-24시간 전, 저온 허혈 중 또는 저온 허혈 0-24시간 후, 장기에 단리된 미토콘드리아를 전달하는 단계를 포함하되,

단리된 미토콘드리아로 처리된 장기의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5% 향상을 가지며,

향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인,

운송, 수송 또는 보관 중, 저온 허혈로 인한 생체외 장기 손상을 최소화하기 위한 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 71

제69항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 장기에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 72

제69항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 장기에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 73

제69항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기에 비해, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 향상된 세포 생존력, 감소된 괴사, 감소된 세포 용해, 증가된 세포 ATP의 총 수준, 감소된 염증성 사이토카인 분비 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함하는 것인, 방법.

청구항 75

제73항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-HNE 및 8-OHdG를 포함하는 것인, 방법.

청구항 76

제69항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 기증자로부터 장기를 적출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 77

제69항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 저온 허혈 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 전에 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 78

제69항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 저온 허혈 중에 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 79

제69항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 저온 허혈 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 후에 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 80

제69항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 전달되는 것인, 방법.

청구항 81

제69항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 장기가 신장인 것인, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 신장 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자로 신장을 이식하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 83

제81항 또는 제82항에 있어서, 기증자로부터 신장을 적출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 84

제69항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 장기가 폐이고, 방법이 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기 내에서 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, PAP, TV, 동적 유순도, PVR, 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 87

제84항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 5% 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상은 향상된 PAP, 향상된 TV, 향상된 동적 유순도, 증가된 포도당/락토스 비율, 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량, 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성, 감소된 PVR , 감소된 락테이트 생성, 감소된 암모늄 생성, 향상된 분당 환기량, 향상된 혈류량, 감소된 폐 부종, 향상된 폐 탄력성, 향상된 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 89

제84항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 간극 연접 마커가 JAM1 및 CD31를 포함하는 것인, 방법.

청구항 91

제89항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함하는 것인, 방법.

청구항 92

제89항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-HNE 및 8-OHdG를 포함하는 것인, 방법.

청구항 93

제89항에 있어서, ROS-매개 케모카인이 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함하는 것인, 방법.

청구항 94

제84항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 폐 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자로 폐를 이식하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 폐 질환 또는 장애가 폐 고혈압, 기관지폐형성이상(BPD), 폐 섬유증, 천식, 수면호흡장애 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)인 것인, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, 만성 혈전색전성 폐 고혈압(CTEPH), 폐동맥고혈압(PAH), 폐 정맥 폐쇄증(PVOD), 폐 모세혈관 혈관종증(PCH), 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 97

제84항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 기증자로부터 폐를 적출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 98

제84항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도를 통해 전달되는 것인, 방법.

청구항 99

제84항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 저장소로부터 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 100

제84항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 101

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행하기 전에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 102

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행하는 동안에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 103

제98항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행한 후에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 104

제97항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 전에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 105

제97항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 후에 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 106

제104항 또는 제105항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 107

제84항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 용액이 스틴 용액, 퍼파덱스, 저 칼륨 덱스트란 용액, 전혈, 희석 혈액, 패키징된 RBC, 대용 혈장제, 하나 이상의 혈관확장제, 중탄산나트륨, 포도당 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 108

제84항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 용액이 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 폐로 도입되는 것인, 방법.

청구항 109

제84항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 폐가 챔버 또는 용기에서 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 환기되는 것인, 방법.

청구항 110

(i) 하나 이상의 세포외 바탕질(extracellular matrix) 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계;

(ii) 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 포퓰레이팅 세포(populating cell)로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계; 및

(iii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 장기 또는 조직에 전달하는 단계

를 포함하는, 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 112

제110항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 장기 또는 조직에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 113

제110항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 장기 또는 조직에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 114

제110항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 116

제110항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직이 조작된 인간 신장인 것인, 방법.

청구항 117

제110항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직이 조작된 인간 폐인 것인, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP, TV, 동적 유순도, PVR, 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 120

제117항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 5% 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 121

제120항에 있어서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상이 향상된 PAP, 향상된 TV, 향상된 동적 유순도, 증가된 포도당/락토스 비율, 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량, 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성, 감소된 PVR , 감소된 락테이트 생성, 감소된 암모늄 생성, 향상된 분당 환기량, 향상된 혈류량, 감소된 폐 부종, 향상된 폐 탄력성, 향상된 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 122

제117항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA

산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 123

제122항에 있어서, 간극 연접 마커가 JAM1 및 CD31를 포함하는 것인, 방법.

청구항 124

제122항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함하는 것인, 방법.

청구항 125

제122항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-HNE 및 8-OHdG를 포함하는 것인, 방법.

청구항 126

제122항에 있어서, ROS-매개 케모카인이 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함하는 것인, 방법.

청구항 127

제110항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 포플레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포(progenitor cell), 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 128

제127항에 있어서, 상피 세포가 I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 129

제127항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 130

제127항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 131

제127항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 132

제110항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 장기 또는 조직 스캐폴드를 포플레이팅하는 단계 후에 조작된 장기 또는 조직에 전달되는 것인, 방법.

청구항 133

제110항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 장기 또는 조직 스캐폴드를 포플레이팅하는 단계 중에 조작된 장기 또는 조직에 전달되는 것인, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 포플레이팅 세포와 함께 조작된 장기 또는 조직에 전달되는 것인, 방법.

청구항 135

제132항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내, 동맥내 또는 관류에 의해 조작된 장기 또는 조직에 전달되는 것인, 방법.

청구항 136

제110항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 장기 또는 조직 스캐폴드를 포퓰레이팅하기 전에, 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아가 주입되는 것인, 방법.

청구항 137

제110항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 장기 또는 조직 스캐폴드가 바이오프린팅에 의해 생성되는 것인, 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 포퓰레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질이 동시에 바이오프린팅되어 조작된 장기 또는 조직을 제조하는, 방법.

청구항 139

(i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계, 및

(ii) 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 140

제139항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 141

제139항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 장기 또는 조직에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 142

제139항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 장기 또는 조직에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 143

제139항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 145

제139항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직이 조작된 인간 신장인 것인, 방법.

청구항 146

제139항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직이 조작된 인간 폐인 것인, 방법.

청구항 147

제146항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응

하는 조작된 인간 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 148

제147항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP, TV, 동적 유순도, PVR, 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 149

제146항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 150

제149항에 있어서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상이 향상된 PAP, 향상된 TV, 향상된 동적 유순도, 증가된 포도당/락토스 비율, 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량, 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성, 감소된 PVR , 감소된 락테이트 생성, 감소된 암모늄 생성, 향상된 분당 환기량, 향상된 혈류량, 감소된 폐 부종, 향상된 폐 탄력성, 향상된 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 151

제146항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 152

제151항에 있어서, 간극 연접 마커가 JAM1 및 CD31를 포함하는 것인, 방법.

청구항 153

제151항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함하는 것인, 방법.

청구항 154

제151항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-HNE 및 8-OHdG를 포함하는 것인, 방법.

청구항 155

제151항에 있어서, ROS-매개 케모카인이 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함하는 것인, 방법.

청구항 156

제139항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 포퓰레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, 상피 세포가 I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 158

제156항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 159

제156항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 160

제156항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 161

제139항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 장기 또는 조직 스캐폴드를 포퓰레이팅하기 전에, 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아가 주입되는 것인, 방법.

청구항 162

제139항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 장기 또는 조직 스캐폴드가 바이오프린팅에 의해 생성되는 것인, 방법.

청구항 163

제162항에 있어서, 포퓰레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질이 동시에 바이오프린팅되어 조작된 장기 또는 조직을 제조하는, 방법.

청구항 164

(i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계,

(ii) 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아를 주입시키는 단계, 및

(iii) 주입된 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 포퓰레이팅 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계

를 포함하는 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 165

제164항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 166

제164항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 장기 또는 조직에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 167

제164항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 장기 또는 조직에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 168

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 장기 또는 조직의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 170

제164항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 장기 또는 조직이 조작된 인간 신장인 것인, 방법.

청구항 171

제164항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 장기 또는 조직이 조작된 인간 폐인 것인, 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 173

제172항에 있어서, 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP, TV, 동적 유순도, PVR, 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 174

제171항에 있어서, 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 175

제174항에 있어서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상이 향상된 PAP, 향상된 TV, 향상된 동적 유순도, 증가된 포도당/락토스 비율, 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량, 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성, 감소된 PVR , 감소된 락테이트 생성, 감소된 암모늄 생성, 향상된 분당 환기량, 향상된 혈류량, 감소된 폐 부종, 향상된 폐 탄력성, 향상된 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 176

제171항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 활성산소종(ROS)-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 177

제176항에 있어서, 간극 연접 마커가 JAM1 및 CD31를 포함하는 것인, 방법.

청구항 178

제176항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함하는 것인, 방법.

청구항 179

제176항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-HNE 및 8-OHdG를 포함하는 것인, 방법.

청구항 180

제176항에 있어서, ROS-매개 케모카인이 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함하는 것인, 방법.

청구항 181

제164항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 포퓰레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 182

제181항에 있어서, 상피 세포가 I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 183

제181항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 184

제181항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 185

제181항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 186

제164항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 장기 또는 조직 스캐폴드가 바이오프린팅에 의해 생성되는 것인, 방법.

청구항 187

제186항에 있어서, 포퓰레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질이 동시에 바이오프린팅되어, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 것인, 방법.

청구항 188

탈세포화된 스캐폴드 폐를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 리포퓰레이팅 세포(repopulating cell)로 리포퓰레이팅하여, 조작된 폐를 제조하는 단계; 및

단리된 미토콘드리아를 조작된 폐에 전달하는 단계

를 포함하는, 조작된 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 189

제188항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 190

제188항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 191

제188항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 192

제188항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 193

제192항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모인 것인, 방법.

청구항 194

제193항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 195

제188항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 리포퓰레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, 상피 세포가 I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 197

제195항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 198

제195항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 199

제195항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 200

제188항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 탈세포화된 스캐폴드 폐를 리포퓰레이팅하는 단계 후에 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 201

제188항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 탈세포화된 스캐폴드 폐를 리포퓰레이팅하는 단계 중에 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 리포퓰레이팅 세포와 함께 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 203

제200항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 204

제188항에 있어서, 저장소의 관류 용액으로 조작된 폐를 관류시킴으로써, 조작된 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 205

제204항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 206

제205항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, PAP, TV, 동적 유순도, PVR, 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는 것인, 방법.

청구항 207

제204항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 208

제207항에 있어서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상이 향상된 PAP, 향상된 TV, 향상된 동적 유순도, 증가된 포도당/락토스 비율, 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량, 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성, 감소된 PVR , 감소된 락테이트 생성, 감소된 암모늄 생성, 향상된 분당 환기량, 향상된 혈류량, 감소된 폐 부종, 향상된 폐 탄력성, 향상된 가스 교환 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 209

제204항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 210

제204항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 저장소로부터 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 211

제209항 또는 제210항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행하기 전에 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 212

제209항 또는 제210항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP를 수행하는 동안에 조작된 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 213

제204항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 용액이 스틴 용액, 퍼파덱스, 저 칼륨 덱스트란 용액, 전혈, 희석 혈액, 패키징된 RBC, 대용 혈장제, 하나 이상의 혈관확장제, 중탄산나트륨, 포도당 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 214

제204항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 관류 용액이 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 조작된 폐로 도입되는 것인, 방법.

청구항 215

제204항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폐가 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 환기되는 것인, 방법.

청구항 216

(i) 단리된 미토콘드리아를 리포플레이팅 세포에 전달하는 단계; 및

(ii) 탈세포화된 스캐폴드 폐를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 리포플레이팅 세포로 리포플레이팅하여, 조작된 폐를 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 217

제216항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 218

제216항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 219

제216항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 220

제216항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 221

제220항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모인 것인, 방법.

청구항 222

제220항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 223

제216항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 리포플레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 224

제223항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 225

제223항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 226

제223항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 227

제216항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 저장소의 관류 용액으로 조작된 폐를 관류시킴으로써, 조작된 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 228

제227항에 있어서, 관류 용액이 스틴 용액, 퍼파덱스, 저 칼륨 덱스트란 용액, 전혈, 희석 혈액, 패키징된 RBC, 대용 혈장제, 하나 이상의 혈관확장제, 중탄산나트륨, 포도당 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 229

제227항 또는 제228항에 있어서, 관류 용액이 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 조작된 폐로 도입되는 것인, 방법.

청구항 230

제227항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폐가 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 환기되는 것인, 방법.

청구항 231

(i) 탈세포화된 스캐폴드 신장을, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 리포플레이팅 세포로 리포플레이팅하여, 조작된 신장을 제조하는 단계; 및

(ii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 신장에 전달하는 단계

를 포함하는, 조작된 신장의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 232

제231항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 233

제231항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 신장에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 234

제231항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 신장에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 235

제231항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 236

제235항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모인 것인, 방법.

청구항 237

제235항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 238

제231항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, 리포플레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 239

제238항에 있어서, 상피 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 240

제239항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 241

제231항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 탈세포화된 스캐폴드 신장을 리포플레이팅하는 단계 후에 조작된 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 242

제231항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 탈세포화된 스캐폴드 신장을 리포플레이팅하는 단계 중에 조작된 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 243

제242항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 리포플레이팅 세포와 함께 조작된 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 244

제231항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 조작된 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 245

(i) 단리된 미토콘드리아를 리포플레이팅 세포에 전달하는 단계; 및

(ii) 탈세포화된 스캐폴드 신장을, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 리포플레이팅 세포로 리포플레이팅하여, 조작된 신장을 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 신장의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 246

제245항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 247

제245항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 신장에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 248

제245항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 조작된 신장에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 249

제245항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장의 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 250

제249항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모인 것인, 방법.

청구항 251

제249항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 252

제245항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 리포플레이팅 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 253

제252항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 254

제1항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 조직, 신장 또는 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 조직, 신장 또는 폐에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는 것인, 방법.

청구항 255

제254항에 있어서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화가 NF-κB의 발현 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 256

제254항에 있어서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화가 MAPK14, JNK 또는 p53의 발현 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 257

제254항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화가 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15 및 TGF-β1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전-염증성 사이토카인 또는 케모카인의 분비 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 258

제254항 내지 제257항 중 어느 한 항에 있어서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화가 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38 및 CD154(CD40L)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성화 마커의 발현

감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 259

제254항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화가 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 발현 또는 분비 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 260

제1항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 조직, 신장 또는 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 조직, 신장 또는 폐에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 기능이 세포 접착(cell adherence), 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 261

제260항에 있어서, 감소된 세포 손상이 감소된 TLR9 발현, 변경된 헴 옥시게나제-1(heme oxygenase-1, HO-1) 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된 것인, 방법.

청구항 262

제261항에 있어서, 변경된 HO-1 발현이 저온 노출 후에 HO-1 발현 증가인 것인, 방법.

청구항 263

제260항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상이, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된 것인, 방법.

청구항 264

제263항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 전-세포자살 마커의 발현 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 265

제264항에 있어서, 적어도 하나의 전-세포자살 마커가 BIM, PUMA, BAX, BAK, SMAC, DIABLO, BID, NOXA, BIK 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 266

제263항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 항-세포자살 마커의 발현 증가와 관련된 것인, 방법.

청구항 267

제266항에 있어서, 적어도 하나의 항-세포자살 마커가 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 268

제1항 내지 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 조직, 신장 또는 폐가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 조직, 신장 또는 폐에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는 것인, 방법.

청구항 269

제268항에 있어서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성이 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의

조합의 발현 증가와 관련된 것인, 방법.

청구항 270

제1항 내지 제269항 중 어느 한 항에 있어서, 장기, 조직, 신장 또는 폐가 인간 장기, 조직, 신장 또는 폐인 것인, 방법.

청구항 271

단리된 미토콘드리아로 전-처리되었던 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포, 또는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포로부터 단리된 세포외 소포를 포함하는 약학 조성물을 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계

를 포함하는, 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 272

(A) 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포, 또는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포로부터 단리된 세포외 소포 및 (B) 단리된 미토콘드리아를 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계로서, 여기서 (A) 및 (B)가 단일 약학 조성물 또는 두 개의 개별 약학 조성물에 포함된 것인 단계

를 포함하는, 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 273

제271항 또는 제272항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 274

제271항 또는 제272항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체 또는 기증자 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 275

제271항 또는 제272항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체 또는 기증자 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 276

제271항 내지 제275항 중 어느 한 항에 있어서, 폐 질환 또는 장애가 폐 고혈압, 기관지폐형성이상(BPD), 폐 섬유증, 천식, 수면호흡장애 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)인 것인, 방법.

청구항 277

제276항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, 만성 혈전색전성 폐 고혈압(CTEPH), 폐동맥고혈압(PAH), 폐 정맥 폐쇄증(PVOD), 폐 모세혈관 혈관종증(PCH), 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 278

(i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계, 및

(ii) 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계

를 포함하고,

조성물이 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 투여되는 것인,

폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법.

청구항 279

제278항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 280

제278항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 281

제278항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 282

제278항 내지 제281항 중 어느 한 항에 있어서, 폐 질환 또는 장애가 폐 고혈압, 천식, 수면호흡장애, BPD, COPD 또는 폐 섬유증인 것인, 방법.

청구항 283

제282항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, CTEPH, PAH, PVOD, PCH, 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 284

제278항 내지 제283항 중 어느 한 항에 있어서, 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물이 트레프로스티닐, 에포프로스테놀, 일로프로스트, 보센탄, 암브리센탄, 마시텐탄 및 실데나필로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 285

(i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계, 및

(ii) 트레프로스티닐을 치료적 유효량으로 투여하는 단계

를 포함하고,

조성물이, 트레프로스티닐의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 투여되는 것인,

폐 고혈압의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 고혈압을 치료하기 위한 방법.

청구항 286

제285항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 287

제285항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 288

제285항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 289

제285항 내지 제288항 중 어느 한 항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, CTEPH, PAH, PVOD, PCH, 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 290

(i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계, 및

(ii) 유넥스(UNEX)-42를 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계

를 포함하고,

조성물이 유넥스-42의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체 또는 기증자 폐에 투여되는 것인,

폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 291

제290항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 292

제290항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 293

제290항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 294

(i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계, 및

(ii) 항산화제를 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계

를 포함하고,

조성물이 항산화제의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체 또는 기증자 폐에 투여되는 것인,

폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법.

청구항 295

제294항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 296

제294항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 297

제294항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 298

제294항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 항산화제가 n-아세틸시스테인, 템폴 또는 레스베라트롤인 것인, 방법.

청구항 299

제294항 내지 제298항 중 어느 한 항에 있어서, 항산화제가 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물의 일부로서 조성물과 동시에 대상체 또는 기증자 폐에 투여되는 것인, 방법.

청구항 300

구제 요법을 위해 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 유효량으로 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 폐 질환 또는 장애의 급성악화를 치료하기 위한 방법.

청구항 301

제300항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 302

제300항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 303

제300항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 304

제300항 내지 제303항 중 어느 한 항에 있어서, 폐 질환 또는 장애가 폐 고혈압, 천식, 수면호흡장애, BPD, COPD 또는 폐 섬유증인 것인, 방법.

청구항 305

제304항에 있어서, 폐 고혈압이 COPD로 인한 폐 고혈압, CTEPH, PAH, PVOD, PCH, 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압인 것인, 방법.

청구항 306

단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 급성 신손상의 치료를 필요로 하는 대상체에서 급성 신손상을 치료하기 위한 방법.

청구항 307

제306항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 308

제306항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 309

제306항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 310

제306항 내지 제309항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계가 대상체에서 하나 이상의 전염증성 사이토카인 또는 전염증성 매개체의 혈청 수준을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 311

제310항에 있어서, 하나 이상의 전염증성 사이토카인 또는 전염증성 매개체가 단핵구 주화인자 단백질 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP1), C3A 및 C5a로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 312

제306항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계가 대상체에서 신손상 분자-1(KIM1) 혈청 수준을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 313

제306항 내지 제312항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계가 대상체에서 혈중 요소질소(BUN) 수준을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 314

제306항 내지 제313항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계가 대상체에서 신장 중량을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 315

단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 유효량으로 대상체에 투여하여 의료시설로의 수송 또는 의학적 치료를 용이하게 하는 단계를 포함하는, 심정지 상태에 있거나 소생법을 받고 있는 대상체를 치료하기 위한 방법.

청구항 316

제315항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 317

제315항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 318

제278항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 흡입에 의해 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 319

제278항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 폐 기도를 통해 대상체 또는 기증자 폐에 투여는 것인, 방법.

청구항 320

제278항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 주사에 의해 대상체 또는 기증자 폐에 투여되는 것인, 방법.

청구항 321

제278항 내지 제320항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 322

제321항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제가 호흡 완충액(respiration buffer), 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소, 장기 또는 조직 보존 용액, 식염수, 물, 평형 염류 용액, 수용성 덱스트로스, 하나 이상의 폴리올 및 식물성 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 323

제278항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 324

제323항에 있어서, 적어도 하나의 활성 성분이 트레프로스티닐, 항산화제, 유넥스-42 및 항염증제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 325

제278항 내지 제324항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간 대상체인, 방법.

청구항 326

사망한 기증자로부터 입수되는, 운송 및 이식용으로 의도된 조직 또는 장기에 단리된 미토콘드리아를 전달하는 단계를 포함하는, 운송 및 이식을 위한 조직 또는 장기를 보존하는 방법.

청구항 327

제326항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 328

제326항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 사망한 기증자에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 329

제326항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 사망한 기증자에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 330

제326항 내지 제329항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자의 죽음 후 24시간 이내에 조직 또는 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 331

제326항 내지 제329항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자의 죽음 후 12시간 이내에 조직 또는 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 332

제326항 내지 제329항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기증자의 죽음 후 4시간 이내에 조직 또는 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 333

제326항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 사망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 적출함으로써, 사망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 입수하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 334

제333항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 사망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 적출하기 전에 조직 또는 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 335

제333항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 사망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 적출한 후에 조직 또는 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 336

제326항 내지 제335항 중 어느 한 항에 있어서, 조직 또는 장기가 심장, 간, 폐, 혈관, 요관, 기관, 피부 패치 또는 신장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 337

제336항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 주사에 의해 조직 또는 장기에 전달되는 것인, 방법.

청구항 338

제336항에 있어서, 조직 또는 장기가 신장인 것인, 방법.

청구항 339

제338항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 정맥내 또는 동맥내로 신장에 전달되는 것인, 방법.

청구항 340

제336항에 있어서, 조직 또는 장기가 폐인 것인, 방법.

청구항 341

제340항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 342

제340항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 EVLP에 의해 폐에 전달되는 것인, 방법.

청구항 343

제326항 내지 제342항 중 어느 한 항에 있어서, 조직 또는 장기가 인간 조직 또는 장기인 것인, 방법.

청구항 344

사지 또는 다른 신체 일부의 외상성 절단 후, 단리된 미토콘드리아를 사지 또는 다른 신체 일부에 전달하는 단계를 포함하는, 외상성 절단으로 인해 손실된 사지 또는 다른 신체 일부를 보존하는 방법.

청구항 345

제344항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 346

제344항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 사지 또는 다른 신체 일부에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 347

제344항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 사지 또는 다른 신체 일부에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 348

제344항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가, 외상성 절단 후, 늦어도 15분, 30분, 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 또는 24시간까지, 절단된 사지 또는 다른 신체 일부에 전달되는 것인, 방법.

청구항 349

제347항 또는 제348항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 주사에 의해 절단된 사지 또는 다른 신체 일부에 전달되는 것인, 방법.

청구항 350

제344항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 사지 또는 다른 신체 일부가 인간 사지 또는 다른 신체 일부인 것인, 방법.

청구항 351

(ii) 단리된 미토콘드리아를 대상체로부터 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계; 및

(iii) 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포를 대상체에 투여하는 단계

를 포함하는, 염증의 감소를 필요로 하는 대상체에서 염증을 감소시키는 방법.

청구항 352

제351항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 353

제351항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 354

제351항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 355

제351항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조혈 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 356

제355항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 357

제351항 내지 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 전에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 조혈 계통 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 358

제351항 내지 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 후에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 조혈 계통 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 359

제351항 내지 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 조혈 계통 세포가 골수 세포 또는 골수 전구세포인 것인, 방법.

청구항 360

제359항에 있어서, 골수 세포 또는 골수 전구세포가 단핵구, 대식세포, 호중구, 조혈모세포, 골수성 프로제니터 세포 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 361

제351항 내지 제360항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 계통 세포가 대상체의 말초 혈액으로부터 단리되는 것인, 방법.

청구항 362

제361항에 있어서, 말초 혈액으로부터 조혈 계통 세포를 단리하기 전에, 대상체가 줄기세포 동원 작용제로 처리되어 있는 것인, 방법.

청구항 363

제362항에 있어서, 줄기세포 동원 작용제가 과립구-집락 자극인자(G-CSF)인 것인, 방법.

청구항 364

제351항 내지 제360항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 계통 세포가 대상체의 골수로부터 단리되는 것인, 방법.

청구항 365

제351항 내지 제364항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 전에, 단리된 조혈 계통 세포를 생체외에서 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 366

제351항 내지 제364항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 후에, 단리된 조혈 계통 세포를 생체외에서 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 367

제365항 또는 제366항에 있어서, 단리된 조혈 계통 세포가 M1 또는 M2 표현형을 갖는 대식세포로 생체외에서 분화되는 것인, 방법.

청구항 368

제351항 내지 제367항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조혈 계통 세포에 비해, NF-κB의 감소된 발현을 갖는 것인, 방법.

청구항 369

제351항 내지 제368항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조혈 계통 세포에 비해, MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 전-염증성 사이토카인 또는 케모카인의 감소된 분비를 갖는 것인, 방법.

청구항 370

제351항 내지 제369항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 단리된 조혈 계통 세포가 주사에 의해 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 371

제351항 내지 제370항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 단리된 조혈 계통 세포가 마이크로캐리어의 일부로서 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 372

제351항 내지 제371항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간 대상체인 것인, 방법.

청구항 373

단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계를 포함하는, 단리된 세포의 세포 기능을 향상시키는 방법.

청구항 374

제373항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 375

제373항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 세포에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 376

제373항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 377

제376항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 378

제373항 내지 제377항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 379

제378항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 380

제378항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 381

제378항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 382

제378항에 있어서, 면역세포가 조혈 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 383

제373항 내지 제382항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 세포외 소포 분비를 갖는 것인, 방법.

청구항 384

제373항 내지 제383항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해 변경된 세포외 소포 조성을 갖는 것인, 방법.

청구항 385

제384항에 있어서, 변경된 세포외 소포 조성이 단백질 함량, 핵산 함량, 지질 함량 또는 이들의 임의의 조합의 측면에서 변경되는 것인, 방법.

청구항 386

제373항 내지 제385항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 전에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 387

제373항 내지 제385항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 후에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 388

제386항 또는 제387항에 있어서, 이종성 단백질이 세포외 소포의 세포로부터 분비되는 것인, 방법.

청구항 389

제373항 내지 제388항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 자가포식, 감소된 마이토파지(mitophagy), 감소된 노화, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성, 감소된 세포 염증, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 장벽 기능, 증가된 혈관신생, 증가된 세포 부착, 증가된 성장 동역학 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 390

제389항에 있어서, 감소된 세포 손상이 감소된 TLR9 발현, 변경된 헴 옥시게나제-1(HO-1) 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된 것인, 방법.

청구항 391

제390항에 있어서, 변경된 HO-1 발현이 저온 노출 후에 HO-1 발현 증가인 것인, 방법.

청구항 392

제389항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상이, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된 것인, 방법.

청구항 393

제389항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 전-세포자살 마커의 발현 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 394

제393항에 있어서, 적어도 하나의 전-세포자살 마커가 BIM, PUMA, BAX, BAK, SMAC, DIABLO, BID, NOXA, BIK 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 395

제389항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 항-세포자살 마커의 발현 증가와 관련된 것인, 방법.

청구항 396

제395항에 있어서, 적어도 하나의 항-세포자살 마커가 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 397

제373항 내지 제396항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는 것인, 방법.

청구항 398

제397항에 있어서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성이 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 발현 증가와 관련된 것인, 방법.

청구항 399

제373항 내지 제398항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체 상에서 향상된 세포 부착 및 성장 동역학을 갖는 것인, 방법.

청구항 400

제399항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 마이크로캐리어인 것인, 방법.

청구항 401

제399항 또는 제400항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체가 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 것인, 방법.

청구항 402

제373항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포보다 저온 허혈에서 생존력을 더 오래 유지하는 것인, 방법.

청구항 403

제373항 내지 제402항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 단리된 인간 세포인 것인, 방법.

청구항 404

(i) 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 시험관내에서 전달하는 단계, 및

(ii) 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포를 대상체에 투여하는 단계

를 포함하는, 세포 요법을 필요로 하는 대상체에서 세포 요법을 향상시키는 방법.

청구항 405

제404항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 406

제404항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 407

제404항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 408

제404항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 409

제408항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 410

제404항 내지 제409항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 411

제410항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 412

제410항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 413

제410항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 414

제410항에 있어서, 면역세포가 조혈 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 415

제404항 내지 제414항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 동종이계 세포인 것인, 방법.

청구항 416

제404항 내지 제414항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 자가유래 세포인 것인, 방법.

청구항 417

제416항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 시험관내에서 전달하는 단계 전에, 대상체로부터 자가유래 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 418

제404항 내지 제417항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로

처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 세포외 소포 분비를 갖는 것인, 방법.

청구항 419

제404항 내지 제418항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 변경된 세포외 소포 조성을 갖는 것인, 방법.

청구항 420

제419항에 있어서, 변경된 세포외 소포 조성이 단백질 함량, 핵산 함량, 지질 함량 또는 이들의 임의의 조합의 측면에서 변경되는 것인, 방법.

청구항 421

제404항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 전에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 422

제404항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 후에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 423

제421항 또는 제422항에 있어서, 이종성 단백질이 세포외 소포의 세포로부터 분비되는 것인, 방법.

청구항 424

제404항 내지 제423항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 주사에 의해 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 425

제404항 내지 제423항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 기도를 통해 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 426

제424항 또는 제425항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 마이크로캐리어의 일부로서 대상체에 투여되는 것인, 방법.

청구항 427

제404항 내지 제426항 중 어느 한 항에 있어서, 처리된 세포가, 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 자가포식, 감소된 마이토파지, 감소된 노화, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 세포 손상, 감소된 활성산소종 생성, 감소된 세포 염증, 증가된 세포 장벽 기능, 증가된 혈관신생, 증가된 세포 부착, 증가된 성장 동역학 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 428

제427항에 있어서, 감소된 세포 손상이 감소된 TLR9 발현, 변경된 헴 옥시게나제-1(HO-1) 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된 것인, 방법.

청구항 429

제428항에 있어서, 변경된 HO-1 발현이 저온 노출 후에 HO-1 발현 증가인 것인, 방법.

청구항 430

제427항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/

또는 감소된 세포 손상이, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된 것인, 방법.

청구항 431

제427항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 전-세포자살 마커의 발현 감소와 관련된 것인, 방법.

청구항 432

제431항에 있어서, 적어도 하나의 전-세포자살 마커가 BIM, PUMA, BAX, BAK, SMAC, DIABLO, BID, NOXA, BIK 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 433

제427항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 항-세포자살 마커의 발현 증가와 관련된 것인, 방법.

청구항 434

제433항에 있어서, 적어도 하나의 항-세포자살 마커가 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 435

제404항 내지 제434항 중 어느 한 항에 있어서, 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는 것인, 방법.

청구항 436

제435항에 있어서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성이 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 발현 증가와 관련된 것인, 방법.

청구항 437

제404항 내지 제436항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체 상에서 향상된 세포 부착 및 성장 동역학을 갖는 것인, 방법.

청구항 438

제437항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체가 마이크로캐리어인 것인, 방법.

청구항 439

제437항 또는 제438항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체가 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 것인, 방법.

청구항 440

제404항 내지 제439항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포보다 저온 허혈에서 생존력을 더 오래 유지하는 것인, 방법.

청구항 441

제404항 내지 제440항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간 대상체인 것인, 방법.

청구항 442

저온 운송, 저온 수송 또는 저온 보관 전, 도중 또는 그 후에 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계를 포함하되,

단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포의 세포에 비해, 생존력의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인,

단리된 세포의 저온 운송, 저온 수송 또는 저온 보관을 향상시키기 위한 방법.

청구항 443

제442항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 444

제442항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 세포에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 445

제442항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 세포에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 446

제442항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 향상된 세포 생존력, 감소된 괴사, 감소된 세포 용해, 증가된 세포 ATP의 총 수준, 감소된 염증성 사이토카인 분비 또는 이들의 임의의 조합을 갖는 것인, 방법.

청구항 447

제446항에 있어서, 염증성 사이토카인이 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함하는 것인, 방법.

청구항 448

제446항에 있어서, ROS-매개 산화 부산물이 4-HNE 및 8-OHdG를 포함하는 것인, 방법.

청구항 449

제442항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖는 것인, 방법.

청구항 450

제449항에 있어서, 향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인 것인, 방법.

청구항 451

제442항 내지 제450항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 452

제451항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 453

제452항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 454

제452항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 455

제452항에 있어서, 면역세포가 조혈 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 456

제442항 내지 제455항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 인간 세포를 동결보존하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 457

제456항에 있어서, 인간 세포를 동결보존하는 단계 전, 인간 세포를 동결보존하는 단계 중, 동결보존으로부터 해동 시, 또는 이들의 임의의 조합에서, 단리된 미토콘드리아가 인간 세포에 전달되는 것인, 방법.

청구항 458

제456항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 인간 세포가 점감적인 액체 N_2 동결에 의해 동결보존되는 것인, 방법.

청구항 459

제442항 내지 제458항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 지질, 단백질, 당류, 다당류 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 용액에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 460

제459항에 있어서, 당류 또는 다당류가 단당류, 이당류 또는 올리고당인 것인, 방법.

청구항 461

제442항 내지 제458항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포가 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 플라스마라이트(PlasmaLyte), 크라이오스토르(CryoStor), DMSO, 지질, 글루타메이트, PEG, PVA, 알부민 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 용액에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 462

동결보호제를 포함하는 동결 완충액에서 단리된 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함하는, 단리된 미토콘드리아를 동결보존하기 위한 방법.

청구항 463

제462항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 464

제462항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 465

제462항 내지 제464항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 조직으로부터 미토콘드리아를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 466

제462항 내지 제465항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제가 지질, 단백질, 당류, 이당류, 올리고당류, 다당류 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 467

제462항 내지 제465항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보호제가 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 플라스마라이트, 크라이오스토르, DMSO, 글루타메이트, PEG, PVA, 알부민 또는 이들의 임의의 조합인 것인, 방법.

청구항 468

제462항 내지 제467항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 점감적인 액체 N_2 동결에 의해 동결보존

되는 것인, 방법.

청구항 469

제462항 내지 제468항 중 어느 한 항에 있어서,

동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및

미토콘드리아 스웰링, 미토콘드리아 막 전위 공극(mPTP) 개방, 미토콘드리아 호흡, 미토콘드리아 막 전위, 완전 미토콘드리아 투과성 및 미토콘드리아 스웰링 중 하나 이상을 측정함으로써, 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강 및/또는 기능을 평가하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 470

제462항 내지 제468항 중 어느 한 항에 있어서,

동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및

전체 미토콘드리아 몰폴로지를 채점하고/하거나 평균 미토콘드리아 크기를 측정함으로써, 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강 및/또는 기능을 평가하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 471

(i) 세포 또는 조직으로부터 미토콘드리아를 단리하는 단계,

(ii) 단리된 미토콘드리아를 저온 보관 완충액에 현탁시키는 단계,

(iii) 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 저온 보관 완충액에서 단리된 미토콘드리아를 동결시키는 단계, 및

(iv) 24시간 이상 동안에 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 유지하는 단계

를 포함하는, 단리된 미토콘드리아를 장기간 보관하기 위한 방법.

청구항 472

제471항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 돼지 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 473

제471항에 있어서, 단리된 미토콘드리아가 단리된 인간 미토콘드리아인 것인, 방법.

청구항 474

제473항에 있어서, 저온 보관 완충액 중 단리된 미토콘드리아가 약 -75℃ 내지 약 -95℃의 온도에서 동결되고, 동결시킨 단리된 미토콘드리아가 약 -75℃ 내지 약 -95℃의 온도에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 475

제474항에 있어서, 저온 보관 완충액 중 단리된 미토콘드리아가 약 -80℃ 내지 약 -90℃의 온도에서 동결되고, 동결시킨 단리된 미토콘드리아가 약 -80℃ 내지 약 -90℃의 온도로 동결되는 것인, 방법.

청구항 476

제471항 내지 제475항 중 어느 한 항에 있어서, 저온 보관 완충액이 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 크라이오스토르 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 것인, 방법.

청구항 477

제476항에 있어서, 저온 보관 완충액이 등장성이고, 약 7.0 내지 약 7.5의 pH를 갖는 것인, 방법.

청구항 478

제477항에 있어서, 저온 보관 완충액이 트레할로스를 포함하는 것인, 방법.

청구항 479

제471항 내지 제478항 중 어느 한 항에 있어서, 동결시킨 단리된 미토콘드리아가 1주 이상 동안 상기 온도에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 480

제471항 내지 제478항 중 어느 한 항에 있어서, 동결시킨 단리된 미토콘드리아가 1개월 이상 동안 상기 온도에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 481

제471항 내지 제478항 중 어느 한 항에 있어서, 동결시킨 단리된 미토콘드리아가 1년 이상 동안 상기 온도에서 유지되는 것인, 방법.

청구항 482

제471항 내지 제481항 중 어느 한 항에 있어서,

(v) 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및

(vi) 미토콘드리아 스웰링, 미토콘드리아 막 전위 공극(mPTP) 개방, 미토콘드리아 호흡, 미토콘드리아 막 전위, 완전 미토콘드리아 투과성 및 미토콘드리아 스웰링 중 하나 이상을 측정함으로써 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강 및/또는 기능을 평가하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 483

제471항 내지 제481항 중 어느 한 항에 있어서,

(v) 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계,

(vi) 유세포 분석을 이용하여 미토콘드리아 스웰링을 측정함으로써 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강을 평가하는 단계, 및

(vii) 유세포 분석-평가된 세포 분류를 이용하여 스웰링 표현형을 갖는 미토콘드리아로부터 건강한 미토콘드리아를 단리하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 484

인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 핵산 마커의 존재를 시험관내 또는 생체외 검출하는 단계로서, 여기서 핵산 마커가 미토콘드리아 DNA 또는 RNA의 서열을 포함하고, 핵산 마커가 돼지 미토콘드리아에 존재하고 인간 미토콘드리아에 부재한 것인 단계

를 포함하는, 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 돼지 미토콘드리아를 검출하기 위한 방법.

청구항 485

제484항에 있어서, 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 핵산 마커를 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 486

제484항 또는 제485항에 있어서, 핵산 마커의 존재가 프라이머 쌍을 이용하는 PCR에 의해 검출되고, 프라이머 쌍의 프라이머 중 적어도 하나가 핵산 마커에 특이적으로 하이브리드화하는 것인, 방법.

청구항 487

제484항 또는 제485항에 있어서, 핵산 마커의 존재가 핵산 마커에 특이적으로 하이브리드화하는 핵산 프로브를 이용하여 검출되는 것인, 방법.

청구항 488

제484항 내지 제487항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 핵산 마커의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 489

인간 세포를 포함하는 조성물로서,

인간 세포의 사이토솔이 외인성 미토콘드리아를 포함하고,

조성물의 인간 세포가 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖고,

향상된 미토콘드리아 기능이 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성인, 조성물.

청구항 490

제489항에 있어서, 외인성 미토콘드리아가 돼지 미토콘드리아인, 조성물.

청구항 491

제490항에 있어서, 외인성 미토콘드리아가 돼지 심장으로부터 유래되는, 조성물.

청구항 492

제489항에 있어서, 외인성 미토콘드리아가 인간 세포에 대해 동종이계의 인간 미토콘드리아인, 조성물.

청구항 493

제489항 내지 제492항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가 상피 세포, 내피 세포, 섬유아세포, 프로제니터 세포, 민무늬근세포, 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포, 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합인, 조성물.

청구항 494

제493항에 있어서, 내피 세포가 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)를 포함하는, 조성물.

청구항 495

제493항에 있어서, 민무늬근세포가 폐 동맥 민무늬근세포를 포함하는, 조성물.

청구항 496

제493항에 있어서, 프로제니터 세포가 내피 프로제니터 세포 및/또는 중간엽 줄기세포를 포함하는, 조성물.

청구항 497

제493항에 있어서, 면역세포가 조혈 세포를 포함하는, 조성물.

청구항 498

제489항 내지 제497항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 증가된 세포외 소포 분비를 갖는, 조성물.

청구항 499

제489항 내지 제498항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해 변경된 세포외 소포 조성을 갖는, 조성물.

청구항 500

제499항에 있어서, 변경된 세포외 소포 조성이 단백질 함량, 핵산 함량, 지질 함량 또는 이들의 임의의 조합의 측면에서 변경되는, 조성물.

청구항 501

제489항 내지 제500항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 502

제501항에 있어서, 이식유전자의 전사가 인간 세포의 핵에서 일어나는, 조성물.

청구항 503

제502항에 있어서, 이식유전자가 인간 세포의 핵 DNA에 안정적으로 통합되는, 조성물.

청구항 504

제502항 또는 제503항에 있어서, 이종성 단백질이 세포외 소포의 인간 세포로부터 분비되는, 조성물.

청구항 505

제501항에 있어서, 이식유전자의 전사가 외인성 미토콘드리아에서 일어나는, 조성물.

청구항 506

제505항에 있어서, 이식유전자가 외인성 미토콘드리아의 미토콘드리아 DNA(mtDNA)에 안정적으로 통합되는, 조성물.

청구항 507

제489항 내지 제506항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가, 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포보다 저온 허혈에서 생존력을 더 오래 유지하는, 조성물.

청구항 508

제489항 내지 제507항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가, 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 자가포식, 감소된 마이토파지, 감소된 노화, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 세포 손상, 감소된 활성산소종 생성, 감소된 세포 염증, 증가된 세포 장벽 기능, 증가된 혈관신생, 증가된 세포 부착, 증가된 성장 동역학 또는 이들의 임의의 조합을 갖는, 조성물.

청구항 509

제508항에 있어서, 감소된 세포 손상이 감소된 TLR9 발현, 변경된 헴 옥시게나제-1(HO-1) 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된, 조성물.

청구항 510

제509항에 있어서, 변경된 HO-1 발현이 저온 노출 후에 HO-1 발현 증가인, 조성물.

청구항 511

제508항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상이, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된, 조성물.

청구항 512

제508항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 전-세포자살 마커의 발현 감소와 관련된, 조성물.

청구항 513

제512항에 있어서, 적어도 하나의 전-세포자살 마커가 BIM, PUMA, BAX, BAK, SMAC, DIABLO, BID, NOXA, BIK 또는 이들의 임의의 조합인, 조성물.

청구항 514

제508항에 있어서, 감소된 세포의 세포자살이 적어도 하나의 항-세포자살 마커의 발현 증가와 관련된, 조성물.

청구항 515

제514항에 있어서, 적어도 하나의 항-세포자살 마커가 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1 또는 이들의 임의의 조합인, 조성물.

청구항 516

제489항 내지 제515항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가, 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는, 조성물.

청구항 517

제516항에 있어서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성이 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 발현 증가와 관련된, 조성물.

청구항 518

제489항 내지 제517항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 세포가, 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체 상에서 향상된 세포 부착 및 성장 동역학을 갖는, 조성물.

청구항 519

제489항 내지 제518항 중 어느 한 항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 520

제519항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체가 마이크로캐리어인, 조성물.

청구항 521

제519항 또는 제520항에 있어서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체가 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는, 조성물.

청구항 522

제489항 내지 제521항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 523

제522항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제가 호흡 완충액, 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소, 장기 또는 조직 보존 용액, 식염수, 물, 평형 염류 용액, 수용성 덱스트로스, 하나 이상의 폴리올 및 식물성 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 524

제489항 내지 제523항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 525

제524항에 있어서, 적어도 하나의 활성 성분이 트레프로스티닐, 항산화제, 유넥스-42 및 항염증제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2019년 6월 18일에 출원된 미국 가특허 출원번호 62/863,034의 우선권을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본원은 세포, 조직 및 장기의 기능을 향상시키기 위한 미토콘드리아, 예컨대 단리된 돼지 미토콘드리아 또는 단리된 인간 미토콘드리아의 용도 및 미토콘드리아의 치료적 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 미토콘드리아는 세포 항상성 및 기능의 유지 및 보존에 핵심적인 역할을 하는 진핵 세포의 이중-막-결합 세포소기관(organell)이다. 예를 들어, 미토콘드리아는 세포 에너지를 공급하고, 세포 신호전달, 세포 분화, 세포의 세포자살, 세포 사이클 조절 및 세포 성장에 핵심적인 역할을 한다. 전형적으로 미토콘드리아는 세포의 ATP 필요량 중 90%를 넘게 공급한다.

[0006] 미토콘드리온은 미토콘드리아 외막, 미토콘드리아 내막, 외막과 내막 사이의 막간 공간, 내막의 인폴딩(infolding)에 의해 형성되는 크레스테 공간, 내막 내의 바탕질 공간, 미토콘드리아-관련 ER 막(MAM) 및 박테리아 게놈과 상당한 유사성을 나타내는 바탕질 내의 독립적인 게놈으로 구성된다. 미토콘드리아 외막은 저분자량 분자가 막을 가로질러 자유롭게 확산하도록 하는 포린(porin)으로 불리는 통합 막 단백질뿐만 아니라, 다양한 종류의 활성, 예컨대 지방산의 연장, 에피네프린의 산화 및 트립토판의 분해에 관여하는 효소를 함유한다. 미토콘드리아 외막의 파괴는 사이토솔로의 미토콘드리아 단백질 누출을 초래하고, 이는 세포자살에 의한 세포 죽음을 유발한다. 미토콘드리아 내막은, 산화적 인산화의 산화환원 반응을 수행하고 바탕질에서 ATP를 생성하는 ATP 합성효소를 함유하는 고도로 불침투성인, 단백질 풍부 막이다.

[0007] 미토콘드리아 손상 및 기능 상실은 세포, 조직 또는 장기에 유해하며 심장 기능장애, 심부전 및 자폐증을 포함하는 후천성 및 유전성 인간 질환 모두에 연루되어 있다. 미토콘드리아 기능장애는 핵 또는 미토콘드리아 게놈 DNA의 유전적 변경, 허혈, 환경 모독, 전염증성 사이토카인, 활성화된 면역세포에 의해 생성된 활성산소종(ROS) 및 산화 스트레스와 관련되는 조건을 포함하는, 다양한 메커니즘에 의해 일어난다. *예를 들어,* Rossignol, D. and R. Frye, Mol Psychiatry 2012, 17:389-401; Suematsu, N. *et al.*, Circulation 2003, 107:1418-23; 및 Fernandez-Checa, J. *et al.*, Am J Physiol. 1997, 273:G7-17를 *참조*하고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 예를 들어, 허혈은 미토콘드리아 복합체 활성, 산소 소모, 산화환원효소 활성, 지방산 및 포도당 대사 및 아데노신 트리포스페이트(ATP) 합성을 감소시키고 칼슘 축적을 증가시키는 것으로 나타났다. *예를 들어*, Faulk, E. *et al.*, Circulation 1995, 92:405-12; Black, K. *et al.*, Physiol Genomics 2012, 44:1027-41; 및 Masuzawa, A. *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013, 304:H966-82를 *참조*하고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 미토콘드리아 DNA의 돌연변이로 인한 질환은 레버 유전성 시신경병증, 멜라스(MELAS) 증후군 및 컨스-세이어(Kearns-Sayre) 증후군을 포함한다.

[0008] 미토콘드리아가 세포 대사에 중대한 역할을 하기 때문에, 미토콘드리아 기능을 향상시키면, 저온 노출 및 허혈과 같은 스트레스 조건에서 세포, 조직 및 장기의 생존력과 기능을 촉진할 수 있다. 자가유래의 미토콘드리아(*즉*, 환자 자신의 신체로부터 단리된 미토콘드리아)의 이식이 일과성 허혈(transient ischemia)로 인한 심근 손상을 감소시켰음이 McCully *et al.*(Mitochondrion 2017, 34:127-34, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 의해 이전에 밝혀졌다. 그러나, 현재, 외인성 미토콘드리아, 예컨대 돼지 미토콘드리아 또는 외인성 인간 미토콘드리아(*즉*, 제2 인간 대상체의 세포, 조직 또는 장기를 처리하기 위해 사용되는 제1 인간 대상체로부터 단리된 미토콘드리아)로 세포, 조직 또는 장기를 처리하는 것을 수반하는, 알려진 승인된 처리 또는 요법이 없다.

[0009] 따라서, 세포 요법, 이식 및 장기/조직 조작의 분야에는, 쉽게 입수할 수 있는 원천으로부터 수득될 수 있고 세포, 조직 또는 장기의 기능 및 생존력을 향상시킬 수 있는 외인성 미토콘드리아에 대한 지속적인 필요성이 있다. 상기 외인성 미토콘드리아는 장기 이식 및 조작의 효능과 효율성을 향상시키는 것, 예를 들어, *생체외* 폐 관류(EVLP) 중에 폐 기능을 향상시키는 것에서 유용성을 확인할 수 있을 것이다. 상기 외인성 미토콘드리아는 또한 저산소 및 저온 허혈과 관련된 세포 손상 및 염증, 예를 들어 적출된 장기, 조직 또는 세포의 저온 보관 또는 수송 중에 발생되는 세포 손상 및 염증을 최소화하는 것에서 유용성을 확인할 수 있을 것이다.

발명의 내용

[0010] 본원은 세포, 조직 또는 장기 기능을 향상시키기 위한 미토콘드리아의 용도 및 미토콘드리아의 치료적 용도에 관한 것이다. 미토콘드리아는 비제한적으로, 포유류인 기증자로부터 수득되는 세포 또는 조직을 포함하는 임의의 적절한 원천으로부터 단리될 수 있다. 포유류 기증자의 비제한적인 예는 인간, 비-인간 영장류, 돼지, 양, 개, 토끼, 마우스 및 래트이다. 본원은 종종 돼지 미토콘드리아의 사용을 지칭하지만, 임의의 적합한 미토콘드리아가 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 청구범위 이외의 개시내용이 "돼지 미토콘드리아"를 지칭할 때, 미토콘드리아는 또한 인간 또는 다른 비-인간 원천으로부터의 미토콘드리아일 수 있음을 이해되어야 한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 미토콘드리아는 외인성 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 외인성 미토콘드리아는 표적 세포, 조직 또는 장기에 대해 이종성이다. 일부 실시양태에서, 외인성 미토콘드리아는 표적 세포, 조직 또는 장기에 대해 동종이계이다. 일부 실시양태에서, 미토콘드리아는 내인성 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 미토콘드리아는 자가유래 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 돼지 미토콘드리아는 인간 세포, 조직 또는 장기를 처리하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 돼지 미토콘드리아는 인간에서의 장기 이식에 사용하기 위해 유전적으로 조작된 돼지 대상체로부터 단리된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 인간 대상체로부터 단리된 미토콘드리아는 제2 인간 대상체 유래의 인간 세포, 조직 또는 장기를 처리하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 인간 미토콘드리아는 이식용으로 의도된 세포, 조직 또는 장기의 기증자로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 인간 미토콘드리아는 세포, 조직 또는 장기 이식의 피이식자로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 인간 미토콘드리아는 세포, 조직 또는 장기 이식의 의도된 피이식자로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 인간 미토콘드리아는 세포, 조직 또는 장기 이식의 의도된 피이식자에 대해 동종이계이다. 일부 실시양태에서, 인간 미토콘드리아는 세포, 조직 또는 장기 이식의 의도된 피이식자에 대해 자가유래이다. 일부 실시양태에서, 이식용으로 의도된 세포, 조직 또는 장기는 이식용으로 의도된 세포, 조직 또는 장기에 대해 동종이계의 미토콘드리아로 처리된다. 일부 실시양태에서, 이식용으로 의도된 세포, 조직 또는 장기는 이식용으로 의도된 세포, 조직 또는 장기에 대해 자가유래의 미토콘드리아로 처리된다.

[0012] 본원은 단리된 미토콘드리아를 이식용으로 의도된 장기에 전달하는 단계를 포함하는 장기 이식 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 조직 또는 장기의 주입 또는 이식 전, 도중 또는 그 후에 단리된 미토콘드리아를 조직 또는 장기에 전달하는 단계를 포함하는, 대상체에서 주입된 조직 또는 이식된 장기의 성능을 향상시키는 방법을 제공하고, 여기서 조직 또는 장기는 기증자 조직, 기증자 장기, 조작된 조직 또는 조작된 장기이다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 단리된 미토콘드리아를 폐에 전달하는 단계, 및 (ii) 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기에서 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 포함하는, *생체외* 폐 관류(EVLP) 중에 폐의 기능을 향상시키는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 저온 허혈 0-24시간 전, 저온 허혈 중 또는 저온 허혈 0-24시간 후, 단리된 미토콘드리아를 장기에 전달하는 단계를 포함하는, 운송, 수송 또는 보관 중에 저온 허혈로 인한 *생체외* 장기 손상을 최소화하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖고, 향상된 미토콘드리아 기능은 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성이다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계, (ii) 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 포퓰레이팅 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계, 및 (iii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 장기 또는 조직에 전달하는 단계를 포함하는, 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드을 준비하는 단계, 및 (ii) 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 포퓰레이팅 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계를 포함하는, 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계, (ii) 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아를 주입시키는 단계, 및 (iii) 주입된 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 포퓰레이팅 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계를 포함하는, 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다.

[0014] 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 탈세포화된 스캐폴드 폐를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 리포퓰레이팅 세포로 리포퓰레이팅하여, 조작된 폐를 제조하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 폐에 전달하

는 단계를 포함하는, 조작된 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 단리된 미토콘드리아를 리포퓰레이팅 세포에 전달하는 단계, 및 (ii) 탈세포화된 스캐폴드 폐를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 리포퓰레이팅 세포로 리포퓰레이팅하여, 조작된 폐를 제조하는 단계를 포함하는, 조작된 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 탈세포화된 스캐폴드 신장을, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 리포퓰레이팅 세포로 리포퓰레이팅하여, 조작된 신장을 제조하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 신장에 전달하는 단계를 포함하는, 조작된 신장의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 미토콘드리아를 리포퓰레이팅 세포에 전달하는 단계, 및 (ii) 탈세포화된 스캐폴드 신장을, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 리포퓰레이팅 세포로 리포퓰레이팅하여, 조작된 신장을 제조하는 단계를 포함하는, 조작된 신장의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공한다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아로 전처리되어 있는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포, 또는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포로부터 단리된 세포외 소포를 포함하는 약학 조성물을 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은, (A) 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포, 또는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포로부터 단리된 세포외 소포 및 (B) 단리된 미토콘드리아를 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 (A) 및 (B)는 단일 약학 조성물 또는 두 개의 개별 약학 조성물에 포함된다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계, 및 (ii) 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 조성물은 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계, 및 (ii) 트레프로스티닐을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐 고혈압의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 고혈압을 치료하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 조성물은 트레프로스티닐의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 투여된다.

[0017] 또 다른 실시양태에서, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계, 및 (ii) 유넥스-42를 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 조성물은 유넥스-42의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계, 및 (ii) 항산화제를 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 조성물은 항산화제의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 구제 요법을 위해 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 유효량으로 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 폐 질환 또는 장애의 급성악화를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 급성 신손상의 치료를 필요로 하는 대상체에서 급성 신손상을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 유효량으로 대상체에 투여하여 의료시설로의 수송 또는 의학적 치료를 용이하게 하는 단계를 포함하는, 심정지 상태에 있거나 소생법을 받고 있는 대상체를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 미토콘드리아를 운송 및 이식용으로 의도된 조직 또는 장기에 전달하는 단계를 포함하는, 운송 및 이식용 조직 또는 장기를 보존하는 방법을 제공하고, 여기서 조직 또는 장기는 사망한 기증자로부터 입수된다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 사지 또는 다른 신체 일부의 외상성 절단 후, 단리된 미토콘드리아를 사지 또는 다른 신체 일부에 전달하는 단계를 포함하는, 외상성 절단으로 인해 손실된 사지 또는 다른 신체 일부를 보존하는 방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 단리된 미토콘드리아를 대상체 유래의 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증 감소를

필요로 하는 대상체에서 염증을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계를 포함하는, 단리된 세포의 세포 기능을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 시험관내에서 전달하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포를 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 세포 요법을 필요로 하는 대상체에서, 세포 요법을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0022] 또 다른 실시양태에서, 본원은 저온 운송, 저온 수송 또는 저온 보관 전, 도중 또는 그 후에, 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계를 포함하는, 단리된 세포의 저온 운송, 저온 수송 또는 저온 보관을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 여기서 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 생존력의 적어도 5%의 향상을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 동결보호제를 포함하는 동결 완충액에서 단리된 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함하는 단리된 미토콘드리아를 동결보존하기 위한 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 (i) 세포 또는 조직으로부터 미토콘드리아를 단리하는 단계, (ii) 단리된 미토콘드리아를 저온 보관 완충액에 현탁시키는단계, (iii) 단리된 미토콘드리아를 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 동결시키는 단계, 및 (iv) 24시간 이상 동안에 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 유지하는 단계를 포함하는, 단리된 미토콘드리아를 장기간 보관하기 위한 방법을 제공한다. 보관 기간은 적어도 24시간, 적어도1주, 적어도 4주, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 9개월 또는 적어도 1년일 수 있다.

[0023] 또 다른 실시양태에서, 본원은 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 핵산 마커의 존재를 *시험관내* 또는 *생체외* 검출하는 단계를 포함하는, 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 돼지 미토콘드리아를 검출하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 핵산 마커는 미토콘드리아 DNA 또는 RNA의 서열을 포함하고, 핵산 마커는 돼지 미토콘드리아에 존재하고, 인간 미토콘드리아에 부재하다.

[0024] 또 다른 실시양태에서, 본원은 인간 세포를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 인간 세포의 사이토솔은 외인성 미토콘드리아를 포함하고, 조성물의 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해 미토콘드리아 기능의 적어도 5%의 향상을 갖고, 향상된 미토콘드리아 기능은 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성이다.

[0025] 본 발명의 추가적인 목적 및 이점은 이하의 설명으로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] **도면 1**(도 1)은 돼지 심장로부터 단리된 미토콘드리아(즉, 돼지 미토콘드리아)를 이용한 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)의 처리가 급성적인 저온 노출 후 산소 소모율(OCR)을 증가시키는 것을 보여준다. HPAEC를 4℃에서 6시간 동안 두었다. HPAEC는 20 μL의 미토콘드리아 현탁액(세포당 29개 입자를 함유하는 호흡 완충액; "+ MITO") 또는 20 μL의 호흡 완충액 단독("- MITO")의 존재 하에 37℃에서 1시간 동안 정상산소상태에서 회복하였고, 비-CO_2 항온처리기에서 10분 동안 평형을 유지하였다. 그 후, 10 μM 올리고마이신, 20 μM FCCP 및 5 μM 로테논/안티마이신 A(Rot/AA)와 함께 시홀스(Seahorse) 기구를 사용하여 "미토콘드리아 스트레스 테스트"를 수행하였다. 돼지 미토콘드리아 처리는, 상응하는 기준선, 올리고마이신-처리, FCCP-처리 또는 Rot/AA-처리 "- MITO" HPAEC 대조군에 비해, 기준선에서 OCR(43.6% 증가), 올리고마이신-처리 HPAEC(204.9% 증가), FCCP-처리 HPAEC(8.4% 증가) 및 Rot/AA-처리 HPAEC(34.1% 증가)를 증가시켰다. 수행된 통계 분석은 양방 t-검증(two-tailed t-test)이었다(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

도면 2(도 2)는 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)의 돼지 미토콘드리아 처리가 만성적인 저온 노출 후 OCR을 증가시키는 것을 보여준다. HPAEC를 4℃에서 12시간 동안 두었다. HPAEC는 20 μL의 미토콘드리아 현탁액(세포 당 172개 입자를 함유하는 호흡 완충액; "+ MITO") 또는 20 μL의 호흡 완충액 단독("- MITO")의 존재 하에 37℃에서 1시간 동안 정상산소상태에서 회복하였고, 비-CO_2 항온처리기에서 50분 동안 평형을 유지하였다. HPAEC를 비-CO_2 조건 하에 37℃에서 시홀스 기구에 남겨 두었다. 그 후, 10 μM 올리고마이신, 20 μM FCCP 및 5 μM 로테논/안티마이신 A(Rot/AA)와 함께 시홀스 기구로 "미토콘드리아 스트레스 테스트"를 수행하였다. 돼지 미토콘드리아 처리는, 상응하는 기준선, 올리고마이신-처리, FCCP-처리 또는 Rot/AA-처리 "- MITO" HPAEC 대조군에 비해, 기준선에서 OCR(32.4% 증가), 올리고마이신-처리 HPAEC(51.9% 증가), FCCP-처리 HPAEC(9.5% 증가) 및 Rot/AA-처리 HPAEC(45.2% 증가)를 증가시켰다. 수행된 통계 분석은 양방 t-검증이었다(** $p < 0.01$).

도면 3(도 3)은 저온 스트레스에 노출된 HPAEC가 돼지 미토콘드리아를 흡수함을 나타낸다. 돼지 미토콘드리아를 저온 스트레스를 겪는 HPAEC에 투여하였다. 저온 회복 군의 경우, 저온 스트레스에서 HPAEC는 투여량-의존 방식으로 돼지 미토콘드리아를 흡수하고, 돼지 MtND5의 최대 발현은 세포당 1,666개 입자에서 달성된다. 저온 회복 조건에서, 돼지 MtND5의 최대 발현은 24시간에 달성되었으며, 여기서 미처리된 저온 회복 대조군에 비해 돼지 MtND5의 26,201% 증가가 관찰되었다. 저온 노출 조건에서, 돼지 MtND5의 최대 발현은 72시간에 달성되었으며, 여기서 미처리된 저온 노출 대조군에 비해 MtND5의 301,932% 증가가 관찰되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석(one-way ANOVA)이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저온 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저온 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저온 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 4(도 4)는 저온 스트레스에 노출된 HPAEC에서 인간 미토콘드리아 DNA의 전사가 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 크게 영향 받지 않음을 보여준다. 저온 회복 조건에서 미처리된 대조군 HPAEC는 정상온도의 대조군에 비해 인간 MtND5 발현의 55% 증가를 나타내었다. 이러한 증가는 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 완화되었으며, 여기서 1개 입자/세포가 미처리된 정상온도의 HPAEC에 비해 3.8%의 발현 감소 및 미처리된 저온 회복 대조군에 비해 33%의 발현 감소를 나타내었다. 저온 노출 군에서, 인간 MtND5의 최대 발현은 72시간에 달성되었지만, 이러한 증가는 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 유의미하게 영향을 받지 않았다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저온 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저온 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저온 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 5(도 5)는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 24시간에 저온 회복에서 NF-κB 발현을 감소시키는 것을 보여준다. 저온 회복 조건에서, 미처리된 대조군 HPAEC는 정상온도의 대조군에 비해 24시간에서 NF-κB 유전자 발현의 83% 증가를 나타내었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 NF-κB 발현을 감소시키는 경향이 있었고, 1개 입자/세포가 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 22% 감소를 나타내었다. 저온 노출 조건에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 24시간에 NF-κB 발현의 약간의 증가가 일어났지만, 이러한 증가는 통계적으로 유의미하지 않다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저온 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저온 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저온 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 6(도 6)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 24시간 후 저온 회복에서 톨-유사 수용체-9(TLR-9) 발현을 감소시키는 것을 보여준다. HPAEC를 처리하고, 저온 회복 또는 저온 노출 조건에서 배양하고, 24시간, 48시간 또는 72시간 시점에서 수확하였다. 저온 회복 조건에서, 미처리된 대조군 HPAEC는 정상온도의 대조군에 비해 24시간에서 TLR-9 발현의 101% 증가를 나타내었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 TLR-9 발현을 감소시키는 경향이 있었고, 166개 입자/세포가 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 37% 감소를 나타내었다. 저온 노출 조건에서, TLR-9의 최대 발현은 1개 입자/세포로 처리된 HPAEC에서 일어났으며, 여기서 미처리된 저온 노출 대조군 HPAEC에 비해 TLR-9 발현의 60% 증가가 관찰되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저온 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저온 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저온 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 7(도 7)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 24시간에서의 저온 노출에서 헴 옥시게나제-1(HO-1)의 발현에 영향을 미치는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 저온 노출 조건에서 HO-1 발현을 증가시켰다. 돼지 미토콘드리아 처리는 16개 입자/세포에서 최대로 효과적이었고, 여기서 미처리된 저온 노출 대조군 HPAEC에 비해 HO-1 발현의 24% 증가가 확인되었다(미처리된 정상온도의 대조군 HPAEC에 비해 242% 증가). 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저온 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저온 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저온 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 8(도 8)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 대식세포-집락 자극 인자(M-CSF) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 최대로 효과적이며, 여기서 M-CSF 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 65% 감소되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간 ; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비

해 & P<0.05 72시간).

도면 9(도 9)는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건 하에서 대식세포 염증성 단백질-1β(MIP-1β) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 MIP-1β 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 MIP-1β 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 73% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소가 확인된다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 10(도 10)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 혈소판 유래 성장 인자-BB(PDGF-BB) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 36개 입자/세포에서 PDGF-BB 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 PDGF-BB 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 69% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소가 확인된다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 11(도 11)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 란테스(RANTES)(CCL5) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 0.3개 입자/세포에서 란테스 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 란테스 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 59% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소가 확인되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도 12(도 12)는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 세포내 부착 분자-1(ICAM-1) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 0.3 입자/세포에서 ICAM-1 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었으며, 여기서 ICAM-1 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 82% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소가 확인된다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간 ; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 13(도 13)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 BDNF 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 BDNF 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 85% 감소되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간 ; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 14(도 14)는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 인터루킨-1β(IL-1β) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 368개 입자/세포에서 IL-1β 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 IL-1β 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 70% 감소되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 15(도 15)는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 성장/분화 인자 15(GDF15) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 GDF15 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 GDF15 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 70% 감소되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 16(도 16)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 인터루킨-6(IL-6) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 368개 입자/세포에서 IL-6 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 IL-6 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 70% 감소되었다. 수행된 통계 분석은 일

원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 17(도 17)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 형질전환 성장 인자-β1(TGF-β1) 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 돼지 미토콘드리아 처리는 36개 입자/세포에서 TGF-β1 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 TGF-β1 분비가 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 95% 감소되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간 ; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 18(도 18)은 저산소 스트레스에 노출된 HPAEC가 돼지 미토콘드리아를 흡수하는 것을 보여준다. 저산소 회복 군의 경우, 돼지 미토콘드리아 처리 전 HPAEC를 24시간 동안 산소정상상태에서 배양한 후, 24시간 동안 저산소(1% O_2)에서 배양하였다. 돼지 미토콘드리아 처리 후, 저산소 회복 세포를 산소정상상태에 되돌려 두었다. 산소정상상태에서의 배양 24, 28 또는 72시간 후에 저산소 회복 HPAEC를 수확하였다. 저산소 노출 군의 경우, HPAEC를 산소정상상태에서 48시간 동안 배양하고, 돼지 미토콘드리아로 처리하고, 즉시 저산소(1% O_2)에 두었다. 저산소 노출 24, 28 또는 72시간 후에 저산소 노출 HPAEC를 수확하였다. 돼지 MtND5에 특이적인 프로브를 사용하여 결정된 바와 같이, 저산소 스트레스 하의 HPAEC는 투여량-의존 방식으로 돼지 미토콘드리아를 흡수하고, 돼지 MtND5의 최대 발현은 세포당 1,666개 입자에서 달성된다. !@# 저산소 회복 조건에서, 돼지 MtND5의 최대 발현은 48시간에 달성되었고, 여기서 미처리된 저산소 회복 대조군에 비해 돼지 mtND5의 4,655% 증가가 관찰되었다. 저산소 노출 조건에서, 최대 발현은 24시간에 달성되었으며, 여기서 미처리된 저산소 노출 대조군에 비해 돼지 mtND5의 26,680% 증가가 관찰되었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 19(도 19)는 저산소 스트레스에 노출된 HPAEC에서 인간 미토콘드리아 DNA의 전사가 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 크게 영향 받지 않음을 보여준다. 인간 MtND5에 특이적인 프로브를 사용하여 결정된 바와 같이, 저산소 회복 군 및 저산소 노출 군 모두에서 인간 MtND5의 최대 발현은 72시간에 일어난다. 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 영향을 받는 것으로 보이는 시점은 24시간에 일어난다. 저산소 회복 군에서 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 인간 MtND5 발현이 감소하는 경향이 있으며, 1개 입자/세포가 24시간에서 미처리된 저산소 대조군에 비해 33% 발현 감소를 나타내었다. 저산소 노출 군에서 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 인간 MtND5 발현이 증가하는 경향이 있으며, 1,666개 입자/세포가 24시간에서 미처리된 저산소 노출 세포에 비해 36% 증가를 초래하였다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간 ; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 20(도 20)은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 회복에서 TLR-9 발현을 감소시키지만, 24시간에서 저산소 노출에서 TLR-9 발현을 증가시킨다는 것을 보여준다. 저산소 회복 군과 저산소 노출 군 모두의 경우, 24시간에서 TLR-9의 최대 발현이 일어난다. 저산소 회복 군에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 TLR-9 발현이 감소하는 경향이 있으며, 1개 입자/세포가 24시간에서 미처리된 저산소 대조군에 비해 38% 감소된 발현을 나타내었다. 저산소 노출 군에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 TLR9 발현이 증가하는 경향이 있으며, 1,666개 입자/세포가 24시간에서 미처리된 저산소 노출 세포에 비해 32% 증가를 초래하였다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 산소정상상태에 비해 # P<0.05 48시간; 산소정상상태에 비해 + P<0.05 72시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 ^ P<0.05 48시간; 저산소 대조군에 비해 & P<0.05 72시간).

도면 21(도 21)은 저산소 스트레스를 겪는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 인터루킨-8(IL-8; CXCL8), IL-6, BH3 상호작용-도메인 사멸 아고니스트(BID), 인간 MtND1 및 인간 미토콘드리아 사이토크롬 B(Mt-CyB)의 mRNA 발현을 감소시키는 것을 보여준다. 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 3,687개 입자/세포에서 IL-8 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 IL-8 발현의 58% 감소가 확인되었다(도 21a). 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 IL-6 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 IL-6 발현의 30% 감소가 확인되었다(도 21b). 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 36개 입자/세포에서 BID 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된

저산소 대조군에 비해 BID 발현의 30% 감소가 확인되었다(도 21c). 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 인간 MtND1 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 MtND1 발현의 57% 감소가 확인되었다(도 21d). 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 0.3 입자/세포에서 인간 Mt-CyB 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 MtCyB 발현의 57% 감소가 확인되었다(그림 21e). 수행된 통계적 분석은 일원 분산분석이었다 산소정상상태에 비해 * P<0.05 24시간; 저산소 대조군에 비해 $ P<0.05 24시간).

도면 22(도 22)는 돼지 미토콘드리아를 이용한 인간 내피 세포의 처리가 미토콘드리아-처리된 HPAEC의 총 세포 단백질 함량의 감소에 의해 나타난 바와 같이 저산소증-유도 세포 증식을 감소시키는 것을 보여준다. HPAEC를 세포당 0, 5, 6 또는 7개의 돼지 미토콘드리아로 처리하였고, 24시간 동안 저산소 조건에 있도록 하였다. 저산소 노출 24시간 후, HPAEC 용해물에 대한 비신코닌산(BCA) 검정을 *통해* 각 샘플에 대한 총 세포 단백질 함량을 측정하였다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(돼지 미토콘드리아로 처리되지 않은 대조군 HPAEC에 비해 * P<0.05).

도면 23(도 23)은 인간 폐포 상피 II형(AT2) 세포의 돼지 미토콘드리아 처리가 AT2 세포의 핵산 함량을 향상시켰음을 보여준다. AT2 세포를 돼지 미토콘드리아가 있거나 없는 저온-보관으로부터 직접 시딩하고, 표준 항온처리기에서 밤새 항온처리하였다. 밤새 항온처리한 후, 돼지 미토콘드리아로 처리된 AT2 세포의 핵산 함량은 미처리된 AT2 세포 대조군에 비해 23% 증가하였다.

도면 24(도 24)는 아데노신 디포스페이트(ADP)를 함유하는 호흡 완충액에서 다양한 농도로 단리된 돼지 미토콘드리아의 미토콘드리아 활성을 보여준다.

도면 25(도 25)는 돼지 미토콘드리아가 -80℃에서의 저온 보관 후 미토콘드리아 활성을 유지함을 보여준다. 미토콘드리아 활성은 시간이 지남에 따라 4℃에서 감소한 반면, -80℃에서 보관은 대략 40% OCR(미토콘드리아 활성)로 유지하였다. 트레할로스에 보관하면 OCR을 향상하여, 원래 OCR 비율에서 약 60%로 유지한다.

도면 26(도 26)은 돼지 미토콘드리아 처리가 *생체외* 폐 관류(EVLP) 동안 단리된 돼지 사체 폐의 기능을 향상시키는 것을 보여준다. 우측 폐 대조군에 비해, 좌측 폐에 주입된 단리된 돼지 미토콘드리아는, 조직학에 의해 측정된 바와 같이(도 26a), 하부 폐(도 26a), 상부 폐(도 26b) 및 중간 폐(도 26c)에서 증식 세포 핵 항원(PCNA) 양성 세포를 증가시켰다. 돼지 미토콘드리아 처리는 하부 폐에서 24시간에 최대로 효과적이었고(도 26a), 여기서 대조군(화살표)에 비해 돼지 미토콘드리아 처리 세포에서 50%의 향상이 확인되었다.

도면 27(도 27)은 돼지 미토콘드리아 처리가 EVLP를 하는 동안 단리된 돼지 사체의 폐의 일회 호흡량(도 27a) 및 동적 압박(dynamic compression)(도 27b)의 매개변수를 향상시키는 것을 보여준다. 단리된 돼지 미토콘드리아를 EVLP 중인 단리된 사체의 폐에 주입하고, 폐가 팽창을 계속하는 동안 관류를 10분 동안 중단하였다. 일회 호흡량(ml) 및 동적 압박(TV/(PIP-PEEP))을 주입 후 10분, 주입 후 1시간 및 주입 후 4시간에 결정하였다(TV = 일회 호흡량; PIP = 최대 흡기압; PEEP = 호기종말양압호흡). 기준 일회 호흡량과 동적 압박은 각각 주입 전 일회 호흡량과 동적 압박을 나타낸다. 기준선에 비해 주입 후 10분에 일회 호흡량의 30% 향상 및 동적 압박의 40% 증가가 확인되었다.

도면 28(도 28)은 EVLP 중인 단리된 돼지 사체의 폐에 단리된 돼지 미토콘드리아를 주입한 후, 배지 포도당의 즉각적이고 점진적인 강하 뿐만 아니라 주입 1시간 후에 순환 암모늄의 17% 감소가 있었음을 보여준다. EVLP 중인 단리된 돼지 사체의 폐에 EVLP 개시 24분 후 단리된 돼지 미토콘드리아를 주입하고, 대략 20시간 동안 EVLP에서 유지하였다. 순환 배지의 포도당(g/L)을 바이오팻(BioPat)(도 28a) 및 노바(Nova)(도 28b)를 사용하여 정량화하고, 순환 암모늄(NH_4^+; mmol/L)을 노바(도 28c)를 사용하여 정량화하였다. 초기 노바 포도당 및 암모늄 수준은 EVLP 후 0시간에서의 노바 포도당 및 암모늄 수준을 나타낸다. 기준선 노바 포도당 및 암모늄 수준은 돼지 미토콘드리아 주입 직전의 노바 포도당 및 암모늄 수준을 나타낸다.

도면 29(도 29)는 EVLP 중인 호흡 완충액이 주입된 돼지 사체의 폐("대조군")에 비해, EVLP 중인 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아의 주입("+Mito")이 일회 호흡량(mL/kg; 도 29a) 및 가스 교환($\Delta PO_2/FiO_2$; 도 29b)을 증가시키는 것을 보여준다.

도면 30(도 30)은 EVLP 중인 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아의 주입("+MITO")이 EVLP 중 호흡 완충액이 주입된 돼지 사체의 폐("대조군")에 비해, 순환 락테이트의 양(mg/ml; 도 30a)을 감소시키고, 이는 포도당/락테이트 비율(도 30b) 증가로 이어지는 것을 보여준다.

도면 31(도 31)은 EVLP 중인 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아의 주입("+MITO")이 호흡 완충액이 주입된 돼지 사체의 폐("대조군")에 비해, 세포자살 세포의 백분율(% 튜넬(TUNEL); 도 31a)을 감소시키고, 세포 부착 분자 CD31의 발현을 증가(도 31b)시키는 것을 보여준다. EVLP 동안 돼지 사체의 폐로부터 취해진 조직 생검에 대한 튜넬 검정에 의해 세포자살 세포의 백분율을 결정하였다. 항-CD31 항체를 갖는 조직 생검의 면역형광 염색에 의해 CD31 발현을 결정하였다.

도면 32(도 32)는 미토콘드리아, 미토콘드리아 막 투과성 전위 공극(mPTP) 개방, 또는 미토콘드리아 호흡의 크기 및 복잡성의 변화를 측정함으로써 단리된 미토콘드리아의 건강 및 기능을 신속하게 평가할 수 있음을 보여준다. 유세포 분석을 사용하여 건강하고 손상된 미토콘드리아의 크기와 복잡성을 측정하였다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 더 크고 덜 복잡하였으며, 이는 미토콘드리아 스웰링 표현형을 시사한다(도 32a). 유세포 분석을 이용해 mPTP 개방을 평가하여, 칼세인 아세톡시메틸(AM)-염색된 미토콘드리아의 녹색 형광(FITC) 방출을 측정하였다. 미토콘드리아가 칼세인-AM을 유지하여 FITC+ 염색을 초래하는 경우, 조절된 mPTP를 갖는 것으로 간주하였다. 미토콘드리아가 칼세인-AM을 유지할 수 없어서 감소된 FITC+ 염색을 초래하는 경우, 불량조절된, 지속적인 mPTP 개방을 갖는 것으로 간주하였다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 칼세인 AM을 유지할 수 없기 때문에 극적으로 감소된 FITC 방출을 가졌다(도 32b). 미토콘드리아 호흡을 평가하기 위해 시홀스 기구를 사용하여 호흡 조절 비율(RCR)을 결정하였다. ADP-자극된 호흡(RCR) 및 분리된 호흡(RCR최대) 동안 산소 소모율(OCR)로부터 RCR을 계산하였다. 이러한 두 가지 상태의 각각에서 OCR을 기초 OCR로 나누어 OCR 비율을 구하였다. 미토콘드리아 프로토노포어 언커플러 BAM15를 주입하여 최대 호흡을 달성하였다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 극적으로 감소된 ADP-자극된 호흡률 및 분리된 호흡률(uncoupled respiration rate)을 가졌다(도 32c).

도면 33(도 33)은 미토콘드리아 막 전위 또는 미토콘드리아 막 투과성을 측정함으로써 단리된 미토콘드리아의 건강 및 기능을 신속하게 평가할 수 있음을 보여준다. 미토콘드리아 JC-1 검정을 사용하여 유세포 분석에 의해 막 전위의 변화를 평가하였다. 미토콘드리아 탈분극은 적색:녹색 형광 강도 비율의 감소 또는 피코에리트린(PE) 채널의 신호 강도 감소로 표시된다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 감소된 적색:녹색 비율 및 극적으로 감소된 PE 방출을 가졌다(도 33a). 손상된 막으로 미토콘드리아에 쉽게 침투하는 시톡스(SYTOX) 녹색 핵산 염색을 사용하여 유세포 분석에 의해 미토콘드리아 투과성을 측정하였다. 시톡스 녹색으로 염색된 손상된 미토콘드리아는 시톡스 녹색으로 염색된 비-손상된 미토콘드리아보다 더 높은 FITC 신호 강도를 가질 것이다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 증가된 FITC 방출을 나타내었다(도 33b).

도면 34(도 34)는 미토콘드리아 크기, 복잡성, mPTP 개방 및 호흡에 의해 측정된 바와 같이, -80℃에서 저온 보관 후 미토콘드리아가 미토콘드리아 기능을 유지하는 것을 보여준다. 유세포 분석을 사용해 미토콘드리아 스웰링의 존재 또는 부재를 평가하여, 비-보존 조건(즉, 4℃에서 보관) 또는 보존 조건(즉, -80℃에서 보관)에서 보관된 미토콘드리아의 크기 및 복잡성을 측정하였다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 거의 즉시 스웰링 표현형(즉, 크기 증가, 복잡성 감소)을 나타내었지만, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 정상적인 표현형을 유지하였다(도 34a). 유세포 분석을 사용해 미토콘드리아 mPTP 개방을 평가하여, 비-보존 조건 또는 보존 조건에서 보관된 칼세인 AM-염색된 미토콘드리아의 FITC 방출을 측정하였다. 미토콘드리아가 칼세인-AM을 유지하여 FITC+ 염색을 초래하는 경우, mPTP를 유지하는 것으로 간주하였다. 미토콘드리아가 칼세인-AM을 유지할 수 없어서 감소된 FITC 염색을 초래한 경우에, mPTP 개방을 유지하지 못하는 것으로 간주하였다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 mPTP 개방을 조절하는 능력을 상실하였으나, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월 까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 mPTP 개방을 제어하였다(도 34b). 비-보존 조건 또는 보존 조건에서 보관된 미토콘드리아의 미토콘드리아 호흡을 평가하기 위해, 시홀스 기구를 사용하여 RCR을 결정하였다. ADP-자극된 RCR 및 분리된 호흡(RCR최대) 동안 OCR로부터 RCR을 계산하였다. 이러한 두 가지 상태의 각각에서 OCR을 기초 OCR로 나누어 OCR 비율을 구하였다. 미토콘드리아 프로토노포어 언커플러 BAM15를 주입하여 최대 호흡을 달성하였다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아의 ADP-자극된 호흡률 및 분리된 호흡률은 시간이 지남에 따라 감소한 반면, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(6주 까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 ADP-자극된 호흡률(도 34c) 및 분리된 호흡률(도 34d)을 가졌다.

도면 35(도 35)는 미토콘드리아 막 전위 및 미토콘드리아 막 투과성에 의해 측정된 바와 같이, -80℃에서 저온 보관 후 미토콘드리아가 미토콘드리아 기능을 유지하는 것을 보여준다. 비-보존 조건(즉, 4℃에서 보관) 또는 보존 조건(즉, -80℃에서 보관)에서 보관된 미토콘드리아의 미토콘드리아 막 전위의 변화를 JC-1 검정을 사용하여 유세포 분석에 의해 평가하였다. 미토콘드리아 탈분극은 적색:녹색 형광 강도 비율의 감소 또는 피코에리트

린(PE) 채널의 신호 강도 감소로 표시된다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 막 전위의 극적인 감소를 보인 반면, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 막전위를 유지하였다(도 35a). 손상된 막으로 미토콘드리아에 쉽게 침투하는, 시톡스 녹색 핵산 염색을 사용하여 유세포 분석에 의해 비-보존 조건 또는 보존 조건에서 보관된 미토콘드리아의 투과성을 측정하였다. 시톡스 녹색으로 염색된 손상된 미토콘드리아는 시톡스 녹색으로 염색된 비-손상된 미토콘드리아보다 더 높은 FITC 신호 강도를 가질 것이다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 FITC 방출의 즉각적인 증가를 가졌지만, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 막 전위를 유지하였다(도 35b).

도면 36(도 36)은 HPAEC에서 활성산소종(ROS)-매개 케모카인 분비를 감소시키는 능력에 의해 측정된 바와 같이, -80℃에서 저온 보관 후 미토콘드리아가 미토콘드리아 기능을 유지하는 것을 보여준다. HPAEC를 미토콘드리아 미처리 또는 처리된 25 μM 메나디온과 함께 배양하였다. 본 실험에 사용된 미토콘드리아를 비-보존 조건(즉, 4℃에서 보관) 또는 보존 조건(즉, -80℃에서 보관)에서 보관하였다. 비드-기반 면역검정을 사용하여 처리된 HPAEC의 배양 배지에서 케모카인을 측정하였다. 4℃에 보관된 미토콘드리아는, 케모카인 분비를 감소시키는 능력을 유지한 -80℃에서 보관된 미토콘드리아에 비해, IL-8/CXCL8(도 36a), MIG/CXCL9(도 36b), MCP-1/CCL2(도 36c) 및 GROα/CXCL1(도 36d)의 분비를 조절하는 능력을 빠르게 상실하였다.

도면 37(도 37)은 -80℃에서 보관된 미토콘드리아가 새로 단리된 미토콘드리아와 동일한 전체 몰폴로지(도 37a) 및 평균 크기(도 37b)를 갖는 것을 보여준다. 클래스 I로 채점된 미토콘드리아는 연속적인 전자 밀도 바탕질 공간에서 수많은 협소한 다형성 크리스테로 표현되는 응축된, 정상 상태(즉, 비-손상 상태)를 가졌다. 클래스 II로 채점된 미토콘드리아는 재구성된 크리스테 및 바탕질 공간을 특징으로 하는 리모델링 상태에 있었다. 리모델링 상태의 출현은 막간공간으로부터의 사이토크롬 c의 재분배 및 가용성과 일시적으로 상관관계가 있다. 클래스 III로 채점된 미토콘드리아는 스웰링되고 손상되었다. 클래스 III 미토콘드리아는 온전한 막을 가졌지만, 이러한 미토콘드리아의 크리스테는 악화되어 있고 미토콘드리아의 주변부 가까이에 모여있다. 클래스 IV로 채점된 미토콘드리아는 말기에 스웰링되거나 파열되었다. 클래스 IV 미토콘드리아는 바탕질의 비대칭 수포를 포함하여, 전체 몰폴로지적 교란을 보였다. "간결한 바탕질(condensed matrix, CM)"로 채점된 미토콘드리아는 제한적인 외막이 없는 간결한 바탕질을 가졌다.

도면 38(도 38)은 온전한 미토콘드리아가 -80℃에서 보관한 후 미토콘드리아로부터 방출되거나 단리 과정에서 이월된 구성요소와는 대조적으로 미토콘드리아 처리에서 기능적 구성요소임을 보여준다. -80℃에서 2주 동안 보관된 미토콘드리아로부터 원심분리에 의해 미토콘드리아 및 비-미토콘드리아 분획을 수득하였다. HPAEC를 25μM 메나디온과 함께 배양하고, 미토콘드리아 분획 또는 비-미토콘드리아 분획으로 체적측정하여 처리하였다. 0.02%, 0.2%, 2% 및 20%의 부피는 각각 1개 미토콘드리아/세포, 10개 미토콘드리아/세포, 100개 미토콘드리아/세포 및 1,000개 미토콘드리아/세포에 해당한다. 분석된 매개변수는 염증성 케모카인 IL-8/CXCL8(도 38a), MCP-1/CCL-2(도 38b) 및 GROα/CXCL-1(도 38c)의 분비뿐만 아니라 세포 손상을 시사하는 락테이트 데하이드로게나제(LDH) 방출(도 38d)을 포함한다. 미토콘드리아 분획이 단독으로, 케모카인 분비 및 LDH 방출을 감소시키는 능력을 보유하였다.

도면 39(도 39)는 돼지 미토콘드리아 처리가 허혈/재관류(I/R) 마우스 모델에서 급성 신손상 후 *생체내*에서 신장 기능 및 회복을 향상시키는 것을 보여준다. 45분 동안 신장 동맥을 클램핑한 후 재관류하여 성체 마우스에서 급성 I/R 손상을 이루어냈다. 1일 차에 재관류 시, 미토콘드리아(0.01x 또는 0.1x) 또는 비히클 대조군을 마우스에 주입하였다. 신장 기능의 지표인 혈중요소질소(BUN)는 I/R 손상 후 증가하였고, 미토콘드리아 주입(0.1x) 후 2일 및 4일 차에 감소하는 경향이 있었다(도 39a). 신장에 의해 흡수된 마우스 중량 퍼센트인 신장 지수는 I/R 손상 후에 증가하였고, 미토콘드리아 주입(0.01x) 후에 감소하였다(도 39b). 신장 손상 분자-1(KIM1)은 급성 신손상의 마커이다. I/R 손상이 KIM1 혈청 수준을 증가시킨 반면, 미토콘드리아 처리는 투여량-반응 방식으로 이러한 수준을 감소시켰다(도 39c). 단핵구 주화인자 단백질 1(MCP1)은 급성 신손상과 관련된 전염증성 사이토카인이다. I/R 손상이 MCP1 혈청 수준을 증가시킨 반면, 미토콘드리아 처리는 투여량-반응 방식으로 이러한 수준을 감소시켰다(도 39d). 보체 시스템의 C3a 및 C5a 구성원은 저산소/재산소화 후 신세뇨관 상피 세포와 대식세포 모두에서 염증 매개체를 유도한다. I/R 손상이 C3a(도 39e) 및 C5a(도 39f)의 혈청 수준을 증가시킨 반면, 미토콘드리아 처리는 이러한 수준을 투여량-의존 방식으로 감소시켰다(도 39e-f). 본 연구에 사용된 미토콘드리아를 주입 전에 -80℃에서 대략 1개월 동안 보관하였다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(샴(sham)에 비해 # $P \leq 0.05$; 모델 + 비히클에 비해 * $P \leq 0.05$).

도면 40(도 40)은 돼지 미토콘드리아 처리가 저온 허혈성 손상 후 EVLP에 놓인 단리된 돼지 사체의 폐에서 간극연접 마커의 발현을 향상시키고 DNA 산화를 감소시켰음을 보여준다. 대략 20시간의 저온 허혈 시간 후에 단리된

돼지 사체의 폐에서 EVLP를 실행하였다. 미토콘드리아 처리는, 위엽(superior lobe)에서 1시간 후 그리고 미엽(caudal lobe)의 원위 분절, 미엽(caudal lobe)의 근위 분절 및 위엽에서 측정했을 때, 4시간 후에, EVLP에서 간극 연접 마커 연접 부착 분자 1(JAM1)(도 40a) 및 CD31(도 40b)의 발현을 향상시켰다. 8-하이드록시-2'-데옥시구아노신(8-OHdG)은 ROS 유도 DNA 산화의 마커이다. 미토콘드리아 처리는 위엽에서 1시간 후 그리고 미엽의 원위 분절, 미엽의 근위 분절, 아래엽(inferior lobe) 및 위엽에서 측정했을 때, 4시간 후에 EVLP 중 폐 조직에서 8-OHdG의 발현을 감소시켰다(도 40c). 단백질 발현을 DAPI 핵 염색에 대해 정규화하고, 모든 데이터를 기준선 사전-EVLP 조직에 대해 정규화하였다. 수행된 통계 분석은 양방 T 검증이었다.

도면 41(도 41)은 돼지 미토콘드리아 처리가 저온 허혈 손상 후 단리된 돼지 사체의 폐에서 IL-6, IL-8 및 인터페론(IFN)-γ 발현 또는 분비를 감소시켰음을 보여준다. 대략 20시간의 저온 허혈 시간 후에 단리된 돼지 사체의 폐에서 EVLP를 실행하였다. 미토콘드리아 처리는, 위엽에서 EVLP 1시간 후 그리고 미엽의 원위 분절, 미엽의 근위 분절 및 위엽에서 EVLP 4시간 후에, IL-8의 폐 조직 용해물 수준을 감소시켰고(도 41b), EVLP 중 순환 IL-6을 감소시켰다(도 41a).

도면 42(도 42)는 EVLP 중 폐 혈관 저항(PVR)에 대한 미토콘드리아 주입의 효과를 보여준다. 단리된 돼지 사체의 폐의 PVR을 EVLP 중에 측정하였다. 6개의 폐("대조군")를 3시간의 EVLP 시간에 비히클로 처리하였고, 5개의 폐를 3시간의 EVLP 시간에 미토콘드리아("Mitochondria")로 처리하였으며, 이들을 분석에 포함시켰다(도 42a). 단일 미토콘드리아-처리된 폐가 도 42b에 도시되며, 어떻게 미토콘드리아 주입이 3-시간 주입에서 시각적으로 보여질 수 있는지 나타낸다. 도 42a 및 도 42b의 점선은 미토콘드리아 주입 시간을 나타낸다. 도 42b의 화살표는 가스 교환이 평가된 시간을 나타낸다. 각 평가 사이에는 동원 사례가 있었다. 수행된 통계 분석은 일원 분산 분석이었다(대조군에 비해 #P≤0.01; 대조군에 비해 *P≤0.05).

도면 43(도 43)은 저온 허혈 손상 후 EVLP에 놓인 단리된 돼지 사체의 폐의 미토콘드리아 처리에 의해 영향을 받는 경로를 보여준다. 단리된 돼지 사체의 폐를 대략 20시간의 저온 허혈 시간에 노출시켰고, 그 후 EVLP를 5시간 동안 폐에 실행하였다. 원위 미부 및 근위 미부 폐 조직을 대조군 완충액 또는 미토콘드리아가 주입된 폐로부터 수집하고, RNA 시퀀싱을 수행하였다. 대조군 샘플에 비해, 미토콘드리아 처리는 염증 및 세포자살 경로를 감소시켰다.

도면 44(도 44)는 미토콘드리아 처리가 ROS-매개 산화 부산물 및 ROS-매개 케모카인 분비를 감소시킨다는 것을 보여준다. HPAEC를 미토콘드리아 미처리 또는 처리된 25 μM의 ROS-유도제 메나디온과 함께 5시간 동안 배양하였다. 산화 스트레스 마커 4-하이드록시노네날(4-HNE) 및 8-OHdG를 경쟁 ELISA에 의해 처리된 세포의 용해물에서 측정하였다. 미토콘드리아 처리는 4-HNE 부가물(도 44a) 및 8-OHdG(도 44b)의 수준을 정상(메나디온 미처리) 수준으로 효과적으로 감소시켰다. 처리된 세포의 세포 배양 상청액을 유세포 분석에 의해 분비된 케모카인의 존재에 대해 분석하였다. 미토콘드리아 처리는 IL-8/CXCL8(도 44c), MCP1/CCL2(도 44d), MIG/CXCL9(도 44e) 및 GROα/CXCL1의 분비를 정상(메나디온 미처리) 수준으로 효과적으로 감소시켰다. 본 실험에 사용된 미토콘드리아를 사용 전 1주 동안 -80℃에서 보관하였다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(25μM 메나디온 미처리에 비해 ***P<0.0001; 25μM 메나디온 미처리에 비해 ****P<0.0001).

도면 45(도 45)는 미토콘드리아 처리가 ROS-매개 손상을 감소시키고 저온/재가온 손상을 받은 HPAEC의 생존력을 향상시킨다는 것을 보여준다. 2차원(2D) 배양 모델에서 저온/재가온 손상을 재현하기 위해, 도 45에 도시된 바와 같이, HPAEC를 4℃에서 24시간 동안 배양(저온 조건)하고, 37℃에서 4시간 동안 재가온(정상온도 조건)하였다. 치료 군은 저체온증의 발병 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC 및 재가온 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC를 포함하였다. 4-시간 재가온 기간 후, HPAEC 용해물에서 4-HNE 단백질 부가물 정량화를 위해 4-HNE 부가물 경쟁 ELISA를 이용하여 ROS-매개 손상을 측정하였다. 매우 낮은 투여량의 미토콘드리아가 영향을 미칠 수 있었는 바, 4-HNE 부가물 형성은 미토콘드리아 처리에 대해 매우 민감하였다(도 45b). 또한, 4-시간 재가온 기간 후에 세포 생존력을 측정하였다. 스트레스가 가해지지 않은 정상적인 HPAEC는 점선으로 표시된다(도 45c). 미토콘드리아 처리는 미처리된 HPAEC에 비해 세포 생존력에서 2-3배 증가를 산출하였다(도 45c).

도면 46(도 46)은 미토콘드리아 처리가 저온/재가온 손상을 받은 HPAEC의 괴사를 감소시킨다는 것을 보여준다. 도 45a에 도시된 2D 배양 방법을 이용하여 저온/재가온 손상을 재현하였다. 치료 군은 저체온증 발병 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC 및 재가온 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC를 포함하였다. 4-시간 재가온 기간 후, 세포 불침투성인, 전형광성(profluorescent) DNA 염료를 사용하여 괴사성 세포 죽음을 측정하였다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 상대적 발광 단위(RLU)로서 도 46a에 도시된다. 미토콘드리아로 처리된 HPAEC는 괴사의 투여량-의존적 감소를 나타냈다(도 46a). 괴사성 세

포 죽음의 특징은 혼합 계통 키나제 도메인 유사 슈도키나제(Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase, MLKL)의 인산화이다. 4-시간 가온 기간 후에 수집된 HPAEC 용해물을 샌드위치 ELISA를 이용해 분석하여 인산-MLKL(pMLKL) 및 전체 MLKL을 측정하였다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 450 nm의 파장에서 측정된 광학 밀도(OD_{450})로 도 46b에 도시된다. 미토콘드리아로 처리된 HPAEC는 pMLKL 수준에서 투여량-의존적 감소를 나타냈다(도 46b). 총 MLKL 수준은 변경되지 않았다(데이터는 표시되지 않음). 하이 모빌리티 군 박스 1(High Mobility Group Box, HMGB-1)은 괴사를 겪는 세포에서 수동적으로 방출되는 유비퀴터스 핵 단백질이다. HPAEC 배양 상청액에서 방출된 HMGB-1을 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 도 46c에 도시된 결과를 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화하였다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 세포에 비해 HMGB-1 방출을 감소시켰다(도 46c). 락테이트 데하이드로게나제(LDH)는 세포 용해 시 방출되는 안정적인 사이토솔 효소이다. HPAEC 배양 상청액에서 방출된 LDH를 30-분 결합 효소 검정으로 측정하였고, 그 결과 테트라졸륨 염(INT)이 적색 포르마잔 산물로 전환되었다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 490 nm의 파장에서 측정된 광학 밀도(OD_{490})로 도 46d에 도시된다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 세포에 비해 LDH 방출을 감소시켰다(도 46d).

스트레스가 가해지지 않은 HPAEC 대조군은 점선으로 도 46a, 46b 및 46d에 표시된다. 도 46c에 도시된 결과를 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화하였다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 세포에 비해 HMGB-1 방출을 감소시켰다(도 46c). 락테이트 데하이드로게나제(LDH)는 세포 용해 시 방출되는 안정적인 사이토솔 효소이다. HPAEC 배양 상청액에서 방출된 LDH를 30-분 결합 효소 검정으로 측정하였고, 그 결과 테트라졸륨 염(INT)이 적색 포르마잔 산물로 전환되었다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 490 nm의 파장에서 측정된 광학 밀도(OD_{490})로 도 46d에 도시된다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 세포에 비해 LDH 방출을 감소시켰다(도 46d). 스트레스가 가해지지 않은, 정상적인 HPAEC 대조군은 점선으로 도 46a, 46b 및 46d에 표시된다.

도면 47(도 47)은 미토콘드리아 처리가 저온/재가온 손상을 받은 HPAEC에서 세포 ATP의 총 수준을 증가시키고, 이는 향상된 세포 생존력과 상관관계가 있다는 것을 보여준다. 도 45a에 도시된 2D 배양 방법을 사용하여 저온/재가온 손상을 재현하였다. 치료 군은 저체온증 발병 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC 및 재가온 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC를 포함하였다. 4-시간 재가온 기간 후, 발광 ATP 검출 검정을 이용하여 세포 ATP의 총 수준을 측정하였다. 도 47a에 도시된 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화되었다. 미토콘드리아 처리된 HPAEC는 미처리된 세포에 비해 ATP 농도가 증가하였다. ATP 농도 증가와 세포 생존력 사이에 양의 상관관계가 있고(도 47b), ATP 농도 증가와 괴사 사이에는 음의 상관관계가 있다(도 47c). 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다.

도면 48(도 48)은 미토콘드리아 처리가 세포 생존력을 향상시키고, 폐 균질액(homogenate)에서 괴사를 감소시키는 것을 보여준다. 저온 보관에서 24시간 후, 폐의 원위 조각을 수집하고, 효소적으로 소화산물화하고, 정상온도(재가온) 세포 배양 조건에 두었다. 미토콘드리아 처리(500개 입자/mg 또는 1,000개 입자/mg)는 습윤 조직 중량을 기준으로 하였다. 미처리된 폐 균질액에 비해, 미토콘드리아 처리는 세포 생존력을 유의미하게 향상시키고(도 48a) 괴사를 감소시켰다(도 48b). 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(미처리에 비해 ****P<0.0001).

도면 49(도 49)는 미토콘드리아 처리가 폐 균질액에 의한 IL-6 및 IFN-γ 분비를 감소시키는 것을 보여준다. 4℃에서 밤새 보관한 후, 폐 조직을 균질화하고, 미토콘드리아 투여량을 증가시키면서 처리하고, 표준 배양 조건(37℃)에서 밤새 항온처리하여다. 표준 조건 하에서 밤샘 배양 후, 폐 균질액 용해물에서 IL-6 및 IFN-γ를 측정하였다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 대조군 폐 균질액에 비해 IL-6 및 IFN-γ의 분비를 감소시켰다. 수행된 통계 분석은 일원 분산분석이었다(INF-γ 대조군에 비해 *P≤0.05; IL-6 대조군에 비해 #P≤0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 이제 상기 발명의 범위를 한정하지 않고 하기 실시예에 의해 설명될 것이다.

[0028] **I. 정의**

[0029] 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 구문이 하기에 정의된다. 달리 언급되지 않은 한, 기술 용어는 관례적 용법에 따라 사용된다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**약**" 및 "**대략**"은, 수치 값 또는 수치 범위를 수식하기 위해 사용될 때, 기재된 값 또는 범위의 의도된 의미 내에서, 값 또는 범위 위로 5% 내지 10% 및 아래로 5% 내지 10%의 편차가 남아있음

을 나타낸다.

[0031] "**투여하는**" (또는 "투여된"과 같은 투여의 임의의 형태)는 본원에 기재된 바와 같이 대상체에게 유효량의 조성물을 전달하는 것을 의미한다. 예시적인 투여 경로는, 비제한적으로 주사(예컨대, 피하, 근육내, 피내 및 정맥내), 경구, 피부 및 경피전달 경로를 포함한다.

[0032] 용어 "**산소결핍**", "**산소결핍성**" 및 "**산소결핍 조건**"은 장기, 조직 또는 세포에 대한 산소 공급이 차단되는 조건을 지칭할 수 있다. 용어 "산소결핍", "산소결핍성" 및 "산소결핍 조건"은 또한, 장기, 조직 또는 세포에 사실상 완전한 산소의 부재를 지칭할 수 있으며, 이는 장기간 지속되면, 장기, 조직 또는 세포의 죽음을 야기할 수 있다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**검출**"은 샘플 내에서 뉴클레오티드, 핵산 또는 단백질을 정량적으로 또는 정성적으로 확인하는 것을 지칭한다.

[0034] 용어 "**분화**"는 미전문화("미수임(uncommitted)") 또는 덜 전문화된 세포가, 예를 들어 신경 세포, 근육 세포 또는 대식세포와 같은 전문화된 세포의 특징을 획득하는 임의의 과정을 지칭한다. 분화된 세포는 세포의 계통 내에서 보다 전문화된("수임(committed)") 위치를 취한 세포이다. 용어 수임은, 분화 과정에 적용될 때, 정상적인 상황에서 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 서브셋으로 계속 분화할 것이며, 정상적인 상황에서 다른 세포 유형로 분화할 수 없거나 덜 분화된 세포 유형로 되돌아갈 수 없는 지점까지 분화 경로를 진행한 세포를 지칭한다.

[0035] 용어 "**외인성(exogenous)**" 및 "**이종성(heterologous)**"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 원핵 또는 진핵 세포에 정상적으로는 존재하지 않는 핵산, 단백질 또는 세포소기관(*예를 들어,* 돼지 미토콘드리아)을 포함한다. 이러한 용어는, 핵산의 일부와 관련하여 사용될 때, 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함함을 나타낸다. 예를 들어, 핵산은 전형적으로 재조합으로 생산되어, 새로운 기능적 핵산(*예를 들어,* 하나의 원천 유래의 프로모터 및 다른 원천 유래의 코딩 영역)을 만들기 위해 배열된 관련되지 않은 유전자들로부터 2개 이상의 서열을 갖는다. 유사하게는, 이종성 단백질은 단백질이 자연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함하는 것을 나타낸다(*예를 들어,* 융합 단백질).

[0036] 용어 "***생체외***"는 유기체 외부에서 발생하는, 유기체로부터 수득된 세포, 조직 또는 다른 샘플에 적용되는 조건을 지칭한다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**동결-해동**" 및 "**동결-해동 사이클**"은 본 발명의 미토콘드리아를 0℃ 미만의 온도로 동결시켜, 미토콘드리아를 0℃ 미만의 온도에서 정의된 기간 동안 유지하고, 미토콘드리아를 실온 또는 체온 또는 본 발명의 방법에 따라 미토콘드리아를 투여할 수 있는 0℃ 초과의 임의의 온도로 해동시키는 것을 지칭한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**실온**"은 18℃ 내지 25℃의 온도를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 동결-해동 사이클을 거친 미토콘드리아는 적어도 -70℃의 온도에서 동결되었다. 또 다른 실시양태에서, 동결-해동 사이클을 거친 미토콘드리아는 적어도 -20℃의 온도에서 동결되었다. 또 다른 실시양태에서, 동결-해동 사이클을 거친 미토콘드리아는 적어도 -4℃의 온도에서 동결되었다. 또 다른 실시양태에서, 동결-해동 사이클을 거친 미토콘드리아는 적어도 0℃의 온도에서 동결되었다. 또 다른 실시양태에 따르면, 미토콘드리아의 동결은 점진적이다. 일부 실시양태에 따르면, 미토콘드리아의 동결은 급속 동결을 통한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**급속-동결**"은 미토콘드리아가 초저온의 영향을 받게하여 이를 빠르게 동결시키는 것을 지칭한다.

[0038] 또 다른 실시양태에 따르면, 미토콘드리아는 동결보호제를 포함하는 동결 완충액에서 동결된다. 일부 실시양태에 따르면, 동결보호제는 지질, 단백질, 당류, 이당류, 올리고당류류, 다당류 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 동결보호제는 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 플라스마라이트, 크라이오스토르, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 글루타메이트, 알부민, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐알코올)(PVA) 또는 이들의 임의의 조합이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다. 또 다른 실시양태에 따르면, 동결 완충액 중 동결보호제 농도는 미토콘드리아 기능을 보존하도록 작용하는 충분한 동결보호제 농도이다. 임의의 이론 또는 메커니즘에 얽매이지 않고, 당류, 이당류(*예를 들어,* 수크로스, 트레할로스), 올리고당 또는 다당류를 포함하는 동결 완충액 내에서 동결되었던 미토콘드리아는, 동결-해동 사이클을 거치지 않았거나 당류, 이당류(*예를 들어,* 수크로스, 트레할로스), 올리고당 또는 다당류가 없는 동결 완충액 또는 단리 완충액 내에서 동결되었던 대조군 미토콘드리아와 비교할 때, 해동 후 비슷하거나 더 높은 산소 소모율을 나타낸다.

[0039] 일부 실시양태에 따르면, 용어 "**기능성 미토콘드리아**"는 산소를 소모하는 미토콘드리아를 지칭한다. 또 다른 실시양태에 따르면, 기능성 미토콘드리아는 온전한 외막을 갖는다. 일부 실시양태에 따르면, 기능성 미토콘드리아

는 온전한 미토콘드리아이다. 또 다른 실시양태에서, 기능성 미토콘드리아는 시간이 지남에 따라 증가한 속도로 산소를 소모한다. 또 다른 실시양태에서, 미토콘드리아의 기능은 산소 소모에 의해 측정된다. 또 다른 실시양태에서, 미토콘드리아의 산소 소모는, 비제한적으로 미토엑스프레스(MitoXpress) 형광 프로브(럭셀(Luxcel)) 및 시홀스 검정과 같은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, 기능성 미토콘드리아는 ADP 및 기질, 예컨대, 비제한적으로 글루타메이트, 말레이트 또는 석시네이트의 존재 하에 산소 소모율의 증가를 나타내는 미토콘드리아이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 기능성 미토콘드리아는 ATP를 생성하는 미토콘드리아이다. 또 다른 실시양태에서, 기능성 미토콘드리아는 이들 자신의 RNA 및 단백질을 제조할 수 있는 미토콘드리아이고, 자가-복제 구조이다. 또 다른 실시양태에서, 기능성 미토콘드리아는 미토콘드리아 리보솜 및 미토콘드리아 tRNA 분자를 생성한다.

[0040] 용어 "**유전자**"는 RNA를 인코딩하는 핵산, 예를 들어, 비제한적으로 폴리펩티드를 인코딩하는 구조적 유전자를 포함하는 핵산 서열을 지칭한다.

[0041] 용어 "**저산소증**", "**저산소**," 및 "**저산소 조건**"은 장기, 조직 또는 세포가 산소의 불충분한 공급을 제공 받는 조건을 지칭한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**온전한 미토콘드리아**"는 외막 및 내막, 막간공간, 크리스테(내막에 의해 형성됨) 및 바탕질을 포함하는 미토콘드리아를 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, 온전한 미토콘드리아는 미토콘드리아 DNA를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 온전한 미토콘드리아는 내막에 매립된 활성 호흡 사슬 복합체(active respiratory chain complex) I-V를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 온전한 미토콘드리아는 산소를 소모한다. 또 다른 실시양태에 따르면, 미토콘드리아 막의 온전함은 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 비제한적인 예에서, 미토콘드리아 막의 온전함은 테트라메틸로다민 메틸 에스테르(TMRM) 또는 테트라메틸로다민 에틸 에스테르(TMRE) 형광 프로브를 사용하여 측정된다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시양태를 나타낸다. 현미경에서 관찰되고 밝은 TMRM 또는 TMRE 염색을 보여주는 미토콘드리아는 온전한 미토콘드리아 외막을 갖는다.

[0043] 용어 "**허혈**"은 특정 장기, 조직 또는 세포에 대한 불충분한 혈액 공급으로 정의된다. 감소된 혈액 공급의 결과는 장기, 조직 또는 세포에 대한 불충분한 산소 공급(저산소증)이다. 장기간의 저산소증은 영향을 받는 장기, 조직 또는 세포에 손상을 초래할 수 있다.

[0044] "**단리된**" 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 형태인 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 더 이상 자연에서 발견되는 형태가 아닌 정도로 정제되어 있는 것들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**단리된 미토콘드리아**"는 다른 세포 구성요소로부터 분리된 미토콘드리아를 지칭하고, 여기서 미토콘드리아의 중량은 미토콘드리아 및 다른 하위-세포 분획의 중량 합의 80% 초과를 구성한다. 단리된 미토콘드리아의 제조는 부분적으로 정제된 미토콘드리아의 제조에 필요하지 않은, 완충 조성물 또는 추가 세척 단계, 세정 사이클, 원심분리 사이클 및 초음파 처리 사이클을 변경하는 것을 수반할 수 있다. 임의의 이론 또는 메커니즘에 얽매이지 않고, 이러한 추가 단계와 사이클은 단리된 미토콘드리아의 기능에 해를 끼칠 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 이종성 원천의 미토콘드리아는 상이한 종으로부터 처리될 대상체와는 다른 대상체로부터 유래된 미토콘드리아를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 자가유래 원천의 미토콘드리아는 처리될 동일한 대상체로부터 유래된 미토콘드리아를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 동종이계 원천의 미토콘드리아는 동일한 종으로부터 처리될 대상체와는 다른 대상체로부터 유래된 미토콘드리아를 지칭한다.

[0046] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**미토콘드리아 막**"은 미토콘드리아 내막, 미토콘드리아 외막 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 미토콘드리아 막을 지칭한다.

[0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**미토콘드리아 단백질**"은 게놈 DNA 또는 mtDNA에 의해 인코딩되는 미토콘드리아 단백질을 포함하는, 미토콘드리아로부터 기원하는 단백질을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**세포 단백질**"은 미토콘드리아가 생성되는 세포 또는 조직으로부터 기원하는 모든 단백질을 지칭한다.

[0048] 용어 "**조절하다(modulate)**" 또는 "**조절하다(modulates)**"는, 하나 이상의 단백질 또는 단백질 서브유닛 또는 펩티드를 인코딩하는 RNA 분자 또는 등가 RNA 분자의 유전자 발현 또는 수준, 또는 하나 이상의 단백질 서브유닛 또는 펩티드의 활성이 상향 조절 또는 하향 조절되어, 상기 발현, 수준 또는 활성이 조절제의 부재 하에 관찰된 것보다 크거나 작도록 하는 것을 의미한다. 용어 "조절하다"는 "억제하다"를 포함한다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**산소정상**" 및 "**산소정상상태**"는 산소가 정상 수준의 상태임을 지칭한다.

[0050] 용어 "**뉴클레오티드 서열**" 및 "**핵산 서열**"은, 비제한적으로 메신저 RNA(mRNA), DNA/RNA 하이브리드 또는 합성 핵산을 포함하는, 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 서열을 지칭한다. 핵산은 단일 가닥 또는 부분적으로 또는 완전히 이중 가닥(이합체)일 수 있다. 이합체 핵산은 동종이합체(homoduplex) 또는 이종이합체(heteroduplex)일 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**장기**"는 특정 기능 또는 기능에 맞춰진, 신체의 일부 또는 구조를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 장기는 폐, 간, 신장, 심장, 췌장 및 위와 장을 포함하는 창자이다.

[0052] 용어 생물학적으로 호환가능한 담체 또는 부형제와 상호교환적으로 사용될 수 있는 용어 "**약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제**"는, 치료적으로 투여될 세포 및 다른 작용제와 호환가능할 뿐만 아니라 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하여 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합한, 시약, 세포, 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 액체, 반고체(*예를 들어*, 겔) 및 고체 물질(*예를 들어*, 세포 스캐폴드 및 바탕질, 튜브 시트 및 당업계에 알려지고 본원에 보다 상세하게 설명된 바와 같은 다른 그러한 물질)을 포함한다. 이러한 반고체 및 고체 물질은 체내 분해에 저항하도록 디자인될 수 있거나(비-생분해성), 체내에서 분해되도록 디자인될 수 있다(생분해성, 생부식성). 생분해성 물질은 추가로 생체흡수성(bioabsorbable) 또는 생체조직흡수성(bioabsorbable)일 수 있으며, 즉, 체액에 용해 및 흡수되거나(하나의 예로서 물-가용성 임플란트), 자연적 경로를 통한 분해 및 제거 또는 다른 물질로의 전환에 의해, 신체로부터 분해되고 궁극적으로 제거될 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**폴리뉴클레오티드**"는 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA)의 중합체를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 아데닌, 사이토신, 구아닌 및 티민/우라실(RNA에 사용되는 우라실)의 4가지 염기로 이루어진다. 핵산으로부터의 코딩 서열은 핵산에 의해 인코딩되는 단백질의 서열을 시사한다. 상기 용어는 당업계에 알려진 다양한 변형 및 유사체를 포함한다.

[0054] 용어 "**단백질**", "**펩티드**", "**폴리펩티드**" 및 "**아미노산 서열**"은 임의의 길이의 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있다. 중합체는 변형된 아미노산 또는 아미노산 유사체를 포함할 수 있고, 아미노산 이외의 화학적 모이어티에 의해 차단될 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적 또는 개입, 예를 들어, 디설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 또는 생리활성 구성요소와의 접합에 의해 변형되어 있는 아미노산 중합체를 포함한다.

[0055] 핵산 또는 폴리펩티드와 관련하여 용어 "**재조합**"은 자연적으로 발생하지 않는 서열을 가지거나 서열의 2개 이상의 달리 분리된 세그먼트의 인공 조합에 의해 만들어진 서열을 갖는 것을 지칭한다. 이러한 인공 조합은 종종 화학적 합성, 또는 보다 통상적으로, *예를 들어* 유전자적 조작 기술에 의해 단리된 핵산 세그먼트의 인공 조작에 의해 달성된다. 재조합 폴리펩티드는 또한 재조합 핵산을 사용하여 제조된 폴리펩티드를 지칭할 수 있으며, 이는 폴리펩티드의 천연 원천이 아닌 숙주 유기체에 전달된 재조합 핵산을 포함한다. 용어 "재조합"은, 세포, 바이러스 또는 벡터와 관련하여 사용될 때, 세포, 바이러스 또는 벡터가 실험실 방법에 의해 변형되었거나 그 결과임을 나타낸다. 재조합 세포, 바이러스 또는 벡터는 이종성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형된 세포, 바이러스 또는 벡터를 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연(비-재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자를 발현하거나, 그렇지 않으면 비정상적으로 발현되거나, 과소 발현되거나, 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현하는 세포를 포함한다.

[0056] 용어 "**재관류**"는 허혈 기간 후에 조직 또는 장기에서 혈류를 재개시키는 것을 지칭한다.

[0057] 용어 "**샘플**"은 가장 넓은 의미로 사용된다. 핵산을 함유하는 것으로 의심되는 샘플은 세포, 세포로부터 단리된 염색체(*예를 들어*, 중기 염색체의 전파), 게놈 DNA, RNA, cDNA 등을 포함할 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**줄기세포**" 및 "**프로제니터 세포**"는 자가 복제 및 전분화능(pluripotency)이 가능한 세포를 지칭한다. 전형적으로, 줄기세포와 프로제니터 세포는 손상된 조직을 재생시킬 수 있다. 본원에서 줄기세포 및 프로제니터 세포는, 비제한적으로 배아 줄기(ES) 세포 또는 조직 줄기세포(조직 특이적 줄기세포 또는 줄기 체세포(somatic stem cell)로도 지칭됨)일 수 있다. 상기 능력을 가질 수 있는 임의의 인공적으로 제조된 세포(*예를 들어*, 본원에서 사용되는 융합 세포, 재프로그래밍된 세포 등)는 줄기세포 또는 프로제니터 세포일 수 있다. ES 세포는 초기 배아로부터 유래된 전분화능 줄기세포이다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "**대상체**"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은, 비제한적으로 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 토끼, 페럿, 설치류(예컨대, 마우스, 래트 및 기니피그), 조류 종(예컨대, 닭), 양서류, 파충류를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 토끼, 페럿 또는 설치류이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 용어 "대상체", "환자" 및 "개체"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0060] 용어 "**형질전환**", "**형질도입**", "**형질전환하는**" 또는 "**형질도입하는**"은 상호교환적으로 사용될 수 있고, 핵산 분자 또는 단백질을 세포 내로 도입하는 과정으로 정의된다. 핵산은 비-바이러스 또는 바이러스 기반 방법을 사용하여 세포 내로 도입된다. 핵산 분자는 완전 단백질 또는 이의 기능적 일부를 인코딩하는 서열일 수 있다. 전형적으로, 핵산 벡터는 단백질 발현에 필요한 요소(*예를 들어*, 프로모터, 전사 시작 사이트 *등*)를 포함한다. 비-바이러스 형질전환 방법은 핵산 분자를 세포 내로 도입하기 위한 전달 시스템으로서 바이러스 DNA 또는 바이러스 입자를 사용하지 않는 임의의 적절한 방법을 포함한다. 예시적인 비-바이러스 형질전환 방법은 칼슘 포스페이트 형질전환, 리포솜 형질전환, 뉴클레오펙션(nucleofection), 소노포레이션(sonoporation), 열 충격을 통한 형질전환, 마그네티펙션(magnetifection) 및 전기천공을 포함한다. 바이러스-기반 방법의 경우, 임의의 유용한 바이러스 벡터가 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 바이러스 벡터의 예는, 비제한적으로 레트로바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스 및 아데노-관련 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 양태에서, 핵산 분자는 당업계에 알려진 표준 절차에 따라 아데노바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 도입된다. 용어 "형질전환" 또는 "형질도입"은 또한 외부 환경으로부터 세포 내로 단백질을 도입하는 것을 지칭한다. 전형적으로, 단백질의 형질도입 또는 형질전환은 세포막을 횡단할 수 있는 단백질 또는 펩티드가 관심 단백질에 부착하는 것에 의존한다. *예를 들어*, Ford, K.G., *et al*., Gene Ther. 2001 Jan;8(1): 1-4 and Prochiantz, A., Nat Methods. 2007 Feb;4(2): 119-20를 *참조*하라.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, "**치료하는**", "**치료**", "**치료하다**" 또는 "**치료하기 위한**"과 같은 용어는 질환, 병리학적 상태 또는 장애의 징후 또는 증상을 개선하는 개입 또는 치료적 조치를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 질환, 장애, 병리학적 상태 또는 증상과 관련하여 용어 "치료하는", "치료", "치료하다" 및 "치료하기 위한"은 또한 치료의 관찰가능한 임의의 유익한 효과를 지칭한다. 유익한 효과는, 예를 들어 다음에 의해 입증될 수 있다: 질환, 병태 또는 장애의 증상 발병 지연; 질환, 병태 또는 장애의 더 느린 진행; 질환, 병태 또는 장애의 재발 횟수 감소; 대상체의 전반적인 건강 또는 웰빙의 향상; 또는 특정 질환, 병태 또는 장애에 특이적인 당업계에 알려진 다른 매개변수. 예방적 치료는 병리현상이 발생할 위험을 줄이려는 목적으로, 질환, 병태 또는 장애의 징후를 나타내지 않거나 초기 징후만 나타내는 대상체에 투여되는 치료이다. 치료적 치료는 질환, 병태 또는 장애의 징후 및 증상이 발생한 후에 대상체에 투여되는 치료이다.

[0062] 용어 "**벡터**"는 숙주 세포에서 하나 이상의 관심 유전자 또는 서열을 전달하고 발현할 수 있는 구성물을 의미한다. 벡터의 예는, 비제한적으로 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 파지 벡터, 양이온성 축합제와 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터 및 프로듀서 세포와 같은 특정 진핵 세포를 포함한다.

[0063] 본원 및 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 형태를 포함한다.

[0064] 실시양태와 관련하여 사용되는 바와 같이, "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "갖는" 등의 용어는 동의어이다. "포함하는(comprising)"의 언어로 본원에 기재된 실시양태의 어디에서든, "구성되는" 및/또는 "본질적으로 구성되는"과 관련하여 기재된 그 외 유사한 실시양태도 제공된다는 것이 이해된다.

[0065] 설명의 목적을 위해, "A/B" 형식 또는 "A 및/또는 B" 형식의 문구는 (A), (B) 또는 (A 및 B)를 의미한다. 설명의 목적을 위해, "A, B 및 C 중 적어도 하나" 형식의 문구는 (A), (B), (C), (A 및 B), (A 및 C), (B 및 C) 또는 (A, B 및 C)를 의미한다.

[0066] 설명은 "실시양태" 또는 "실시양태들"을 사용할 수 있고, 이들은 동일하거나 상이한 실시양태 중 하나 이상을 각각 지칭할 수 있다.

[0067] **II. 장기 이식 방법**

[0068] 본원은 장기 이식 방법을 제공하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 이식용으로 의도된 장기에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 장기는 인간 기증자 유래, 동종이계, 이종, 비-인간 기증자(*예를 들어,* 돼지) 유래 또는 전체든 부분적이든 조작된 것이다(*예를 들어,* 이식용으로 재세포화된 돼지 신장으로부터 탈세포

화된 바탕질). 일부 실시양태에서, 방법은 기증자로부터 장기를 적출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기를 피이식자로 이식하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 피이식자에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 피이식자에 대해 자가유래의 단리된 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 이식용으로 의도된 장기는 인간 기증자로부터 적출된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 인간 기증자에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 인간 기증자에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 이식용으로 의도된 장기는 돼지 장기 스캐폴드로부터 조작된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다.

[0069] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100%의 향상을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 장기를 적출하는 단계 전에 장기에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 장기를 적출하는 단계 후에 장기에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 장기는 인간 장기이다. 다른 실시양태에서, 장기는 피이식자로의 이종이식을 위한 돼지 장기이다.

[0070] 바람직한 실시양태에서, 장기는 폐이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 폐고혈압을 앓고 있는 인간 피이식자로 이식된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 폐는 인간 폐이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달된다.

[0071] 바람직한 실시양태에서, 장기는 신장이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 신장은 신장 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자로 이식된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 신장은 인간 신장이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 정맥내 또는 동맥내로 신장에 전달된다.

[0072] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 신장 또는 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 신장 또는 폐에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인의, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0073] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 신장 또는 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 신장 또는 폐에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 헴 옥시게나제-1(HO-1) 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살(pro-apoptotic) 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 Bax, Bid, Bad 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20%

또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 Bcl-2 및/또는 Mcl-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0074] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 신장 또는 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 신장 또는 폐에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, GLUT, VDAC1, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0075] 또한, 본원은 대상체에서 주입된 조직 또는 이식된 장기의 성능을 향상시키는 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 조직 또는 장기의 주입 또는 이식 전, 도중 또는 그 후에 조직 또는 장기에 전달하는 단계를 포함하고, 여기서 조직 또는 장기는 기증자 조직, 기증자 장기, 조작된 조직 또는 조작된 장기이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조직 또는 장기에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조직 또는 장기에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 조직 또는 장기는 인간 조직 또는 장기이다. 다른 실시양태에서, 조직 또는 장기는 대상체로 이종이식하기 위한 돼지 조직 또는 장기이다. 바람직한 실시양태에서, 장기는 신장이다. 바람직한 실시양태에서, 장기는 폐이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 폐는 인간 폐이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 조직 또는 장기는 혈관, 요관, 기관 및 피부 패치로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 장기는 신장이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 신장은 인간 신장이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 정맥내 또는 동맥내로 신장에 전달된다.

[0076] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조직 또는 장기의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기 또는 조직의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100%의 향상을 갖는다.

[0077] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조직 또는 장기는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조직 또는 장기에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0078] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조직 또는 장기는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조직 또는 장기에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제

제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0079] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조직 또는 장기는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조직 또는 장기에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0080] 일부 실시양태에서, 조직 또는 장기는 바이오프린팅에 의해 생성된다. *예를 들어,* Murphy, S.V. and Atala, A., Nat Biotechnol. 2004, 32(8):773-85를 *참조*하라.

[0081] 향상된 미토콘드리아 기능의 비제한적인 예는 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 아데노신 트리포스페이트(ATP) 합성이다.

[0082] 단리된 미토콘드리아를 장기 또는 조직에 전달하는 경로의 비제한적인 예는 폐의 기도를 통한 전달, 정맥내 전달 및 동맥내 전달이다.

[0083] **III. 장기, 조직 또는 폐 기능을 향상시키는 방법**

[0084] 본원은 *생체외* 폐 관류(EVLP)를 받는 폐의 기능을 향상시키는 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 폐에 전달하는 단계, 및 (ii) 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기에서 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100%의 향상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 폐는 인간 폐이다.

[0085] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 활성산소종(ROS)-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 간극 연접 마커는 연접 부착 분자 1(JAM1) 및 CD31을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-8 및 인터페론-감마(IFN-γ)을 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-하이드록시노네날(4-HNE) 및 8-하이드록시데옥시구아노신(8-OHdG)을 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 케모카인은 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 방법은 EVLP를 수행하기 전에 기증자로부터 폐를 적출하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 EVLP를 수행하기 전 기증자로부터 폐를 적출하는 단계, 및 EVLP를 수행한 후 피이식자에 폐를 이식하는 단계를 추가로 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 피이식자는 폐 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자이다. 일부 실시양태에서, 폐 질환 또는 장애는 폐 고혈압, 기관지폐형성이상(BPD), 폐 섬유증, 천식, 수면호흡장애 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)이다. 폐 고혈압의 비제한적인 예는 COPD로 인한 폐 고혈압, 만성 혈전색전성 폐 고혈압(CTEPH), 폐동맥 고혈압(PAH), 폐 정맥 폐쇄증(PVOD), 폐 모세혈관 혈관종증(PCH), 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또

는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행하기 전에 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행하는 동안 폐에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행한 후 폐에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 전에 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 후 폐에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 전에, 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 후에, 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달된다.

[0089] 바람직한 실시양태에서, 관류 용액은 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 폐에 도입된다. 바람직한 실시양태에서, 폐는 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 챔버 또는 용기에서 환기된다.

[0090] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 간극 연접 마커는 JAM1 및 CD31을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-HNE 및 8-OHdG를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 케모카인 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0092] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된

발현과 관련된다.

[0093] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0094] 안정, 유지 또는 향상된 EVLP 매개변수의 비제한적인 예는, 안정 또는 향상된 폐 동맥압(PAP); 향상 또는 유지된 일회 호흡량(TV); 향상 또는 유지된 동적 유순도(TV/(최대 흡기압(PIP) - 호기종말양압호흡(PEEP))); 증가된 포도당/락토스 비율; 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량(*예를 들어,* 튜넬 검정에 의해 측정된 바와 같은 감소된 세포 죽음); 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성; 안정 또는 향상된(즉, 감소된) 폐 혈관 저항(PVR); 감소된 락테이트 생성; 감소된 암모늄 생성; 향상된 분당 환기량; 향상된 혈류량; 감소된 폐 부종; 향상된 폐 탄력성; 및 안정 또는 향상된 가스 교환이다. 증가된 CD31 발현은 혈관신생 및 간극 연접 형성을 시사한다.

[0095] 관류 용액의 비제한적인 예는 스틴 용액, 퍼파덱스, 저 칼륨 덱스트란 용액, 전혈, 희석 혈액, 패키징된 적혈구(RBC), 대용 혈장제, 하나 이상의 혈관확장제, 중탄산나트륨, 포도당 및 이들의 임의의 조합이다.

[0096] 단리된 미토콘드리아를 폐에 전달하는 비제한적인 예는 기도를 통한 전달, 챔버 또는 용기의 저장소로부터의 전달, 정맥내 전달 및 동맥내 전달이다.

[0097] 본원은 운송, 수송 또는 보관 중 저온 허혈로 인한 *생체외* 장기 손상을 최소화하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 저온 허혈 0-24시간 전, 저온 허혈 중 또는 저온 허혈 0-24시간 후, 장기에 전달하는 단계를 포함하고, 여기서 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖고, 향상된 미토콘드리아 기능은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 장기에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 장기에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 방법은 기증자로부터 장기를 적출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 저온 허혈 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 전에 장기에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 저온 허혈 중 장기에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 저온 허혈 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 후에 장기에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 장기는 인간 장기이다. 다른 실시양태에서, 장기는 인간 대상체로 이종이식을 위한 돼지 장기이다.

[0098] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기에 비해, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 향상된 세포 생존력, 감소된 괴사, 감소된 세포 용해, 증가된 세포 ATP의 총 수준, 감소된 염증성 사이토카인 분비 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-HNE 및 8-OHdG를 포함한다.

[0099] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기는 신장이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 장기는 신장이고, 방법은 단리된 미토콘드리아로 처리된 신장을 신장 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자로 이식하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 장기는 신장이고, 방법은 기증자로부터 신장을 적출하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 장기는 신장이고, 방법은 기증자로부터 신장을 적출하는 단계, 및 단리된 미토콘드리아로 처리된 신장을 신장 질환 또는 장애를 앓고 있는 인간 피이식자로 이식하는 단계를 추가로 포함한다.

[0100] 바람직한 실시양태에서, 장기는 폐이고, 방법은 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기에서 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 장기는 폐이고, 방법은 기증자로부터 폐를 적출하는 단계, 및 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기에서 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 장기는 폐이고, 방법은 기증자로부터 폐를 적출하는 단계, 저장소의 관류 용액으로 폐를 관류시킴으로써, 챔버 또는 용기에서 폐에 EVLP를 수행하는 단계, 및 폐고혈압을 앓고 있는 인간 피이식자로 폐를 이식하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드

리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100%의 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 폐는 인간 폐이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행하기 전에 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행하는 동안 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행한 후 폐에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 전, 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자로부터 폐를 적출하는 단계 후, 폐에 전달된다.

[0102] 바람직한 실시양태에서, 관류 용액은 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 폐로 도입된다. 바람직한 실시양태에서, 폐는 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 챔버 또는 용기에서 환기된다.

[0103] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 신장 또는 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 신장 또는 폐에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0104] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 신장 또는 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 신장 또는 폐에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0105] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 장기, 신장 또는 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 장기, 신장 또는 폐에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증

가된 발현과 관련된다.

[0106] 또한, 본원은 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계, (ii) 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 포플레이팅 세포로 포플레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계, 및 (iii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 장기 또는 조직에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 장기 또는 조직에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 장기 또는 조직에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 조작된 인간 장기 또는 조직이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 조작된 인간 신장이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 장기 또는 조직은 조작된 인간 폐이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP; TV; 동적 유순도; PVR; 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상은 향상된 PAP; 향상된 TV; 향상된 동적 유순도; 증가된 포도당/락토스 비율; 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량; 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성; 감소된 PVR; 감소된 락테이트 생성; 감소된 암모늄 생성; 향상된 분당 환기량; 향상된 혈류량; 감소된 폐 부종; 향상된 폐 탄력성; 향상된 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0108] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 간극 연접 마커는 JAM1 및 CD31을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-HNE 및 8-OHdG를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 케모카인은 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 장기 또는 조직 스캐폴드를 포플레이팅하는 단계 후에 조작된 장기 또는 조직에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 장기 또는 조직 스캐폴드를 포플레이팅하는 단계 중에 조작된 장기 또는 조직에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 장기 또는 조직 스캐폴드를 포플레이팅하는 단계 중에 포플레이팅 세포와 함께, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 조작된 장기 또는 조직에 전달된다.

[0110] 일부 실시양태에서, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 장기 또는 조직 스캐폴드를 포플레이팅하기 전에, 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아가 주입된다.

[0111] 일부 실시양태에서, 장기 또는 조직 스캐폴드는 바이오프린팅에 의해 생성된다. 바람직한 실시양태에서, 포플레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질은 동시에 바이오프린팅되어 조작된 장기 또는 조직을 제조한다. *예를 들어,* Murphy, S.V. 및 Atala, A., Nat Biotechnol. 2004, 32(8):773-85를 *참조*하라.

[0112] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지

않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0113] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0114] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 조작된 장기 또는 조직에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0115] 포퓰레이팅 세포의 비제한적인 예는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 및 이들의 임의의 조합이다.

[0116] 단리된 미토콘드리아를 조작된 장기 및 조직에 전달하는 비제한적인 예는 정맥내 전달, 동맥내 전달, 기관내 전달 또는 관류에 의한 전달 또는 림프계 또는 기관지 순환을 통한 전달이다.

[0117] 또한, 본원은 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계, 및 (ii) 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 포퓰레이팅 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 장기 또는 조직에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 장기 또는 조직에 대해 자가유래

의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 조작된 인간 장기 또는 조직이다.

[0118] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 장기 또는 조직은 조작된 인간 폐이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP; TV; 동적 유순도; PVR; 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100%의 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상은 향상된 PAP; 향상된 TV; 향상된 동적 유순도; 증가된 포도당/락토스 비율; 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량; 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성; 감소된 PVR; 감소된 락테이트 생성; 감소된 암모늄 생성; 향상된 분당 환기량; 향상된 혈류량; 감소된 폐 부종; 향상된 폐 탄력성; 향상된 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0119] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 간극 연접 마커는 JAM1 및 CD31을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-HNE 및 8-OHdG를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 케모카인은 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 장기 또는 조직 스캐폴드를 포퓰레이팅하기 전에, 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아가 주입된다.

[0121] 일부 실시양태에서, 장기 또는 조직 스캐폴드는 바이오프린팅에 의해 생성된다. 바람직한 실시양태에서, 포퓰레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질은 동시에 바이오프린팅되어 조작된 장기 또는 조직을 제조한다. *예를 들어*, Murphy, S.V. 및 Atala, A., Nat Biotechnol. 2004, 32(8):773-85를 *참조*하라.

[0122] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된

다.

[0123] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0124] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0125] 또한, 본원은 조작된 장기 또는 조직의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함하는 장기 또는 조직 스캐폴드를 준비하는 단계, (ii) 장기 또는 조직 스캐폴드에 단리된 미토콘드리아를 주입하는 단계, 및 (iii) 주입된 장기 또는 조직 스캐폴드를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 포퓰레이팅 세포로 포퓰레이팅하여, 조작된 장기 또는 조직을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 장기 또는 조직에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 장기 또는 조직에 대해 자가유래의 단리된 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 폐의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 장기 또는 조직은 조작된 인간 장기 또는 조직이다.

[0126] 일부 실시양태에서, 조작된 장기 또는 조직은 조작된 인간 신장이다. 일부 실시양태에서, 조작된 인간 장기 또는 조직은 조작된 인간 폐이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 인간은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP; TV; 동적 유순도; PVR; 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상은 향상된 PAP; 향상된 TV; 향상된 동적 유순도; 증가된 포도당/락토스 비율; 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량; 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성; 감소된 PVR; 감소된 락테이트 생성; 감소된 암모늄 생성; 향상된 분당 환기량; 향상된

혈류량; 감소된 폐 부종; 향상된 폐 탄력성; 향상된 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0127] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 인간 조작된 폐에 비해, 향상된 간극 연접 마커의 발현, 감소된 ROS-유도 DNA 산화, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 감소된 ROS-매개 케모카인 분비, 감소된 염증성 사이토카인 수준, 감소된 세포자살 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 간극 연접 마커는 JAM1 및 CD31을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-HNE 및 8-OHdG를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 케모카인은 IL-8, CXCL9, MCP-1 및 GROα를 포함한다.

[0128] 일부 실시양태에서, 장기 또는 조직 스캐폴드는 바이오프린팅에 의해 생성된다. 바람직한 실시양태에서, 포플레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질은 동시에 바이오프린팅되어 조작된 장기 또는 조직을 제조한다. *예를 들어*, Murphy, S.V. 및 Atala, A., Nat Biotechnol. 2004, 32(8):773-85를 *참조*하라.

[0129] 일부 실시양태에서, 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0130] 일부 실시양태에서, 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 조작된 장기 또는 조직은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 장기 또는 조직에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0132] 또한, 본원은 조작된 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 탈세포화된 스캐폴드 폐를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 리포플레이팅 세포로 리포플레이팅하여, 조작된 폐를 제조하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 폐에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 폐는 조작된 인간 폐이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 탈세포화된 스캐폴드 폐를 리포플레이팅하는 단계 후, 조작된 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 탈세포화된 스캐폴드 폐를 리포플레이팅하는 단계 중에 조작된 폐에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 탈세포화된 스캐폴드 폐를 리포플레이팅하는 단계 중에, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 리포플레이팅 세포와 함께 조작된 폐에 전달된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기도, 정맥내 또는 동맥내로 조작된 폐에 전달된다.

[0134] 일부 실시양태에서, 방법은 저장소의 관류 용액으로 조작된 폐를 관류시킴으로써 조작된 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 인간 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 인간 폐에 비해, PAP; TV; 동적 유순도; PVR; 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합의 증진된 안정성 또는 유지성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 폐에 비해, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 하나 이상의 EVLP 매개변수의 향상은 향상된 PAP; 향상된 TV; 향상된 동적 유순도; 증가된 포도당/락토스 비율; 세포 죽음의 감소된 조직학적 측정량; 증가된 혈관신생 및 간극 연접 형성; 감소된 PVR; 감소된 락테이트 생성; 감소된 암모늄 생성; 향상된 분당 환기량; 향상된 혈류량; 감소된 폐 부종; 향상된 폐 탄력성; 향상된 가스 교환; 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행하기 전에 조작된 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP를 수행하는 동안에 조작된 폐에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기도, 정맥내 또는 동맥내로 조작된 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 저장소로부터 조작된 폐에 전달된다.

[0135] 일부 실시양태에서, 관류 용액은 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 조작된 폐로 도입된다. 관류 용액의 비제한적인 예는 스틴 용액, 퍼파텍스, 저 칼륨 덱스트란 용액, 전혈, 희석 혈액, 패키징된 RBC, 대용 혈장제, 하나 이상의 혈관확장제, 중탄산나트륨, 포도당 및 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 조작된 폐는 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 챔버 또는 용기에서 환기된다.

[0136] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도

2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0137] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0138] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0139] 리포플레이팅 세포의 비제한적인 예는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 및 이들의 임의의 조합이다.

[0140] 또한, 본원은 조작된 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 리포플레이팅 세포에 전달하는 단계, 및 (ii) 탈세포화된 스캐폴드 폐를, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 리포플레이팅 세포로 리포플레이팅하여, 조작된 폐를 제조하는 단계를 포함한다. 마찬가지로, 방법은 세포가 탈세포화된 스캐폴드에 전달되기 전, 도중, 그 후 또는 이들의 조합에서, 단리된 미토콘드리아로 처리되어 있는 세포를 사용하여 탈세포화된 스캐폴드 폐를 리포플레이팅하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 폐는 조작된 인간 폐이다.

[0141] 일부 실시양태에서, 방법은 저장소의 관류 용액으로 조작된 폐를 관류시킴으로써, 조작된 폐에 EVLP를 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 관류 용액은 캐뉼러 삽입된 폐 동맥을 통해 조작된 폐로

도입된다. 일부 실시양태에서, 조작된 폐는 캐뉼러 삽입된 기관을 통해 챔버 또는 용기에서 환기된다.

[0142] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0143] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0144] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 폐는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 폐에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0145] 또한, 본원은 조작된 신장의 기능을 향상시키기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 (i) 탈세포화된 스캐폴드 신장을, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 리포퓰레이팅 세포로 리포퓰레이팅하여, 조작된 신장을 제조하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아를 조작된 신장에 전달하는 단계를 포함한다, 마찬가지로, 방법은 세포가 탈세포화된 스캐폴드에 전달되기 전, 도중, 그 후 또는 이들의 조합에서, 단리된 미토콘드리아로 처리되어 있는 세포를 사용하여 탈세포화된 스캐폴드 신장을 리포퓰레이팅하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 신장에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 신장에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도

100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 증가된 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 신장은 조작된 인간 신장이다.

[0146] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 탈세포화된 스캐폴드 신장을 리포퓰레이팅하는 단계 후에 조작된 신장에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 탈세포화된 스캐폴드 신장을 리포퓰레이팅하는 단계 중에 조작된 신장에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 탈세포화된 스캐폴드 신장을 리포퓰레이팅하는 단계 중에 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서 리포퓰레이팅 세포와 함께 조작된 신장에 전달된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 정맥내 또는 동맥내로 조작된 신장에 전달된다.

[0147] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0148] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1 또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0149] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0150] 리포플레이팅 세포의 비제한적인 예는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 면역세포, 중간엽세포, 주피세포 및 이들의 임의의 조합이다.

[0151] 또한, 본원은 조작된 신장의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 리포플레이팅 세포에 전달하는 단계, 및 (ii) 탈세포화된 스캐폴드 신장을, 바이오리액터, 챔버 또는 용기에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 리포플레이팅 세포로 리포플레이팅하여, 조작된 신장을 제조하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 신장에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 조작된 신장에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장의 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능을 갖고, 하나 이상의 향상된 세포, 장기 또는 조직 기능은 스캐폴드에 대한 증가된 세포 접착, 증가된 세포 생존력, 감소된 세포자살, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 증식, 증가된 세포 장벽 기능, 감소된 DNA 손상, 증가된 혈관신생, 향상된 혈관 보전, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성 또는 이들의 임의의 조합이다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 신장은 조작된 인간 신장이다.

[0152] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 MAPK14, JNK 또는 p53의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 NF-κB의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 분비와 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 활성화 마커, 예컨대 CD69, CD95, CD30, CD137, CD25(IL2RA), CD38, CD154(CD40L) 및 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 염증 및/또는 면역세포 활성화는 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL17, TNF-α, IFN-γ 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현 또는 분비와 관련된다.

[0153] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80%의, 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1

또는 MCL-1의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0154] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조작된 신장은 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조작된 신장에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0155] 본 방법의 일부 실시양태에서, 조작된 장기, 조직, 신장 또는 폐는 인공 장기 또는 조직 바탕질을 사용하여 생성된다. 인공 장기 또는 조직 바탕질을 제조하기 위한 방법 및 물질은 당업계에 알려져 있다. 상기 바탕질 제조를 위해 임의의 적합한 물질이 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 인공 장기 또는 조직 바탕질은 예를 들어, 폴리글리콜산, 플루로닉 F-127(PF-127), 겔폼(Gelfoam) 스펀지, 콜라겐-글리코스아미노글리칸(GAG), 피브리노겐-피브로넥틴-비트로넥틴 하이드로겔(FFVH) 및 엘라스틴과 같은 다공성 물질로부터 발달된 스캐폴드일 수 있다. *예를 들어*, Ingenito *et al*., J Tissue Eng Regen Med. 2009 Dec 17; Hoganson *et al*., Pediatric Research, 2008, 63(5):520-526; Chen et al., Tissue Eng. 2005 Sep-Oct; 11(9-10): 1436-48을 *참조*하라. 일부 경우에, 인공 장기 또는 조직 바탕질이 폐포 단위와 유사한 다공성 구조를 가질 수 있다. Andrade *et al*., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007, 292(2):L510-8을 *참조*하라. 일부 경우에, 이식된 인공 장기 또는 조직 바탕질은 장기-특이적 마커(*예를 들어*, 클라라 세포(Clara cell)(즉, 클럽 세포(club cell)), 폐포세포 및 호흡 상피에 대한 폐-특이적 마커)를 발현할 수 있다. 일부 경우에, 이식된 인공 장기 또는 조직 바탕질은 식별 가능한 구조(*예를 들어*, 인공 폐 바탕질의 폐포 및 말단 기관지와 유사한 구조)로 조직될 수 있다. 예를 들어, FFVH를 사용하여 제조된 이식된 인공 폐 바탕질은 주변 조직에 대한 영양 효과(trophic effect)의 증거와 함께, *시험관내* 세포 부착, 전파 및 세포외 바탕질 발현 및 생체내 명백한 생착을 촉진할 수 있다. *앞선* Ingenito *et al*.*을 참조*하라. *또한*, 미국 특허 번호 7,662,409 및 6,087,552; 미국 특허 공개 번호 2010/0034791; 2009/0075282; 2009/0035855; 2008/0292677; 2008/0131473; 2007/0059293; 2005/0196423; 2003/0166274; 2003/0129751; 2002/0182261; 2002/0182241; 및 2002/0172705를 *참조*하라. 바람직한 실시양태에서, 포플레이팅 세포의 대사, 부착 및 생존력을 지원하기 위해 포플레이팅 세포를 시딩하는 단계 전에 인공 장기 또는 조직 바탕질에 단리된 미토콘드리아가 주입된다.

[0156] 일부 실시양태에서, 인공 장기 또는 조직 바탕질은 바이오프린팅에 의해 생성된다. *예를 들어*, Murphy, S.V. and Atala, A., Nat Biotechnol. 2004, 32(8):773-85를 *참조*하라. 바람직한 실시양태에서, 포플레이팅 세포 및 인공 장기 또는 조직 바탕질은 동시에 프린팅되어 포플레이팅된 장기 또는 조직 바탕질을 형성한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는, 바이오프린팅의 초기 기간 동안 세포 생존력을 지원하기 위해서, 인쇄하는 동안에 포플레이팅 세포 및/또는 바탕질과 함께 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 포플레이팅 세포의 대사, 부착 및 생존력을 지원하기 위해 포플레이팅 세포를 시딩하는 단계 전에, 바이오프린팅된 장기 또는 조직 바탕질에 단리된 미토콘드리아가 주입된다.

[0157] 본 방법의 일부 실시양태에서, 사체의 장기는 이식에 사용하기 위해 준비되고 유지된다. 인간 및 동물 기증자로부터 기증자 장기(*예를 들어*, 폐 및 신장)를 분리하는 방법 및 물질은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Pasque, M. *et al*., J Thorac Cardiovasc Surg. 2010, 139(1):13-7 및 Bribriesco A. *et al*., Front Biosci 2013, 5:266-72에 기재되었다. 이들을 분리하는 적절한 방법이 사용될 수 있다. 이러한 기증자 장기는, 이식을 위한 피이식자를 준비시키기에 충분한 시간, 피이식자에게 장기를 수송하기에 충분한 시간, 또는 이식에 적합하도록 장기 전체 또는 이의 일부의 보수를 용이하게 하는 조건에서 장기를 유지하기에 충분한 시간 동안, 바이오리액터, 챔버 또는 용기를 사용하여 유지될 수 있다.

[0158] 일부 실시양태에서, 장기 기증자 유래의 기증자 장기를 변형하여, 내피 라이닝(endothelial lining)을 제거한 후, 피이식자-유래 내피 세포로 재시딩하여, 면역원성을 최소화할 수 있다. 예를 들어, 이것은 탈이온수를 이용한 관류, 0.05%의 폴리도카놀(Polidocanol)과 같은 낮은 세정제 농도를 이용한 관류 또는 DN아제 또는 콜라게나제와 같은 효소 용액을 이용한 관류를 통한 삼투 시도에 의해 달성될 수 있다. 감염, 물리적 손상, 예컨대 외상 또는 장기간의 저관류에 따른 허혈성 손상 또는 기증자 조건, 예컨대 뇌사에 따른 손상으로 인해 즉각적인 이식에 부적합한 것으로 확인된 기증자 장기는 본원에 기재된 디바이스 및 방법(*예를 들어*, 항생제, 세포, 성장 인자 자극 및 항-염증 치료를 이용하여, 회복, 관류 및 마운팅하는 것)을 사용하여 회복될 수 있다. 동물 유래 장기는 유전적 및 세포적 변형에 의해 면역원성을 낮출 수 있다.

[0159] 일부 경우에, 기증자 폐는 다양한 인자, *예를 들어*, 기증자 폐의 품질, 보존 용액의 종류, 적출과 배양 사이의 시간 길이 등으로 인한 손상의 증거를 나타낼 수 있다. 손상 정도를 감소 및/또는 제거하기 위해, 기증자 폐 및/또는 이의 일부는, *예를 들어*, 본원에 기재된 디바이스 및 액체 및/또는 건식 환기에 마운팅될 수 있다. 예로서, 공기는 기관 라인을 통해 관류되는 반면에, 심실 및/또는 동맥 라인은 생리학적 매개변수를 모방하는 용액, *예를 들어*, 생리 식염수 용액, 혈액 함유 용액, 스틴 용액, 퍼파텍스 및/또는 보존 용액으로 관류된다. 기증자 폐는 이식을 위해 기증자 폐가 필요할 때까지 및/또는 손상된 기증자 폐가 재상피화를 나타내고 향상된 폐 기능(*예를 들어*, 향상된 내피 장벽 기능, 향상된 혈류량, 감소된 폐부종 및/또는 부분 흡기 산소에 대한 동맥 산소 부분압의 향상된 비율(PaO2/FiO2))을 나타낼 때까지 마운팅된 상태로 있을 수 있다. 이러한 관류 방법은 이하에 설명된 바와 같이, 세포 시딩 방법과 조합될 수 있다.

[0160] 본원에 기재된 방법 중 일부에서, 폐 또는 신장 조직 바탕질, *예를 들어*, 탈세포화된 폐 또는 신장 조직 바탕질 또는 인공 폐 또는 신장 바탕질은, 세포, *예를 들어*, 분화 또는 재생세포로 시딩된다. 나이브(Naive) 또는 미분화 세포 유형와 같은 적절한 재생세포 유형을 사용하여, 폐 또는 신장 조직 바탕질을 시딩할 수 있다. 세포는 비제한적으로, 줄기세포 단계(*예를 들어*, 유도 후), 프로제니터 세포 단계, 혈관모세포 단계 또는 분화 단계(*예를 들어*, CD 31+, CD144+)를 포함하는 다양한 단계에서 시딩될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 재생세포는 비제한적으로, 프로제니터 세포, 전구세포 및 제대 세포(예를 들어, *예를 들어*, 인간 재정맥 내피 세포) 및 태아 줄기세포를 포함하는 "성체"-유래 줄기세포를 포함할 수 있다. 재생세포는 또한 분화 또는 수임된 세포 유형을 포함할 수 있다. 본원에 제공되는 방법 및 물질에 적합한 줄기세포는 인간 유도 전분화능 줄기세포(iPSC)(*예를 들어*, 미분화, 분화 내배엽, 안테리올라이즈드(anteriolized) 내배엽, TTF-1 양성 폐 프로제니터), 인간 중간엽 줄기세포, 인간 재정맥 내피 세포, 다능성 성체 프로제니터 세포(MAPC), iPS 유래 중간엽세포 또는 배아줄기세포를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 다른 조직으로부터 유래된 재생세포도 사용될 수 있다. 예를 들어, 피부, 뼈, 근육, 심장, 골수, 활막, 와튼제대교질(Wharton's jelly), 태반, 포피 또는 지방 조직으로부터 유래된 재생세포를 사용하여 줄기세포-시딩된 조직 바탕질을 발달시킬 수 있다.

[0161] 일부 경우에, 본원에 제공된 폐 또는 신장 조직 바탕질은, 대안적으로 또는 추가적으로, 분화된 세포 유형, 예컨대 (바람직하게는 인간) 상피 세포 및 내피 세포로 시딩될 수 있다. 예를 들어, 폐 바탕질은 맥관구조를 *통해*(*예를 들어*, 동맥 라인 또는 정맥 라인을 통해) 내피 세포로 시딩될 수 있고, 기도를 통해(*예를 들어*, 기관 라인을 통해) 상피 세포로 시딩될 수 있다. 또한, 폐 또는 신장 바탕질은, 하나 이상의 세포 유형(*예를 들어*, 상피 및 중간엽세포, 성체 말초 혈액 유래 상피 세포, 제대혈 유래 상피 세포, iPS 유래 상피 세포, 프로제니터 단계 세포(*예를 들어*, 민무늬근), 성체 폐 유래 세포 혼합물(*예를 들어*, 쥐 인간), 상업적으로 입수가능한 소기도 상피 세포 또는 폐포 상피 세포, 배아 줄기(ES) 세포 유래 상피 세포 및/또는 인간 제정맥 내피 세포(HUVEC)의 종류 중 하나 이상)로 시딩될 수 있다. 임의 종류의 상업적으로 입수가능한 적절한 배지 및/또는 배지 키트가 세포의 시딩 및 배양을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, SAGM 배지는 소기도 세포에 사용될 수 있고(*예를 들어*, 론자(Lonza)의 SAGM 불렛키트(BulletKit)), EGM-2 키트는 내피 세포에 사용될 수 있다(*예를 들어*, 론자의 EGM-2 불렛키트). 예를 들어, Brudno, Y. *et al*., Biomaterials 2013, 34:9201-9에 기재된 바와 같이, 시딩된 내피 세포 유형에 맞춤화된 배지가 (예를 들어, 성장 인자, 예컨대 VEGF를 증가시키거나 감소시킴으로써) 사용될 수 있다. 내피 세포의 경우, 일련의 상이한 배지 조성물을 이용하여, 세포의 시딩, 확장, 생착 및 성숙의 상이한 단계를 유도할 수 있다. 예를 들어, 제1 단계에서, 세포 시딩된 구성물은 내피 세포 확장, 이동 및 대사를 증가시키기 위해 2-30일 동안 '혈관형성 배지'로 관류될 수 있다. 이러한 배지는 고농도의 사이토카인, *예를 들어*, 5-100 ng/ml의 VEGF 및 5-100 ng/ml의 bFGF 및 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA), *예를 들어*, 5-100 ng/ml의 PMA의 존재를 특징으로 하며, 이는 내피 세포 발아를 자극하는, Ang-1 및 단백질 키나제 C의 활성화를 통해 혈관형성 경로를 활성화시킨다. 그 후, 제2 단계에서, 세포 시딩된 구성물은 내피 성숙 및 긴밀한 접합의 형성을 지원하는 '긴밀 배지(tightening media)'로 관류될 수 있다. 긴밀 배지는, 혈관형성 배지와 기본 조성이 동일하지만, 감소된 수준의 VEGF, bFGF 및 PMA(0.1-5 ng/ml VEGF, FGF 및 PMA)를 갖는, 더 낮은 수준의 사이토카인을 갖는다. 긴밀한 접합 형성을 촉진하고 폐부종을 감소시키는 것으로 밝혀진 하이드로코르티손을 긴밀 배지에 추가로 첨가하여, 혈관 성숙을 촉진할 수 있다. 또한, PDGF 및 Ang-2와 같은 전성숙 인자(promaturation factor)를 긴밀 배지에 추가하여 혈관 형성을 증진시킬 수 있다. 이러한 인자의 농도는 상이한 혈관 크기를 지원하기 위해 적정될 수 있다. 배지 변경은 갑작스러운 사이토카인 변화의 해로운 영향을 피하기 위해 점진적으로 수행될 수 있다. 내피 세포 지원 배지와 유사하게, 순차적 배지 변경을 이용하여 상피 세포 운명을 유도할 수 있다. 초기 배지는, 예를 들어, 진정 내배엽(definite endoderm)을 유도하기 위해 10-200 ng/ml의 액티빈 A 및 Pi3K 억제제, 예컨대 0.01-1 uM의 ZSTK 474, 후속적으로, 전방 내배엽을 유도하기 위해 TGF-베타 억제제, 예컨대 01-10 uM의 A-8301 및 BMP4 안타고니스트, 예컨대 0.05-1 uM의 DMH-1 및 최종적으로 폐 프로제니터 세포

생성을 유도하기 위해 1-100 ug/ml의 BMP4, 10-500 ng/ml의 FGF2, GSK-3베타 억제제, 예컨대 10-500 nM의 CHIR 99021, PI3K 억제제, 예컨대 1- 100 nM의 PIK-75 및 1-100 nM의 메토트렉세이트를 함유할 수 있다.

[0162] 시딩을 위해 세포를 단리하고 수집하기 위한 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 유도 전분화능 줄기세포는 일반적으로 Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC, Nanog 및 Lin28과 같은 전사 인자의 이소성(ectopic) 발현에 의해 전분화능 상태로 "재프로그래밍된" 체세포로부터 수득될 수 있다. Takahashi *et al.*, Cell 2007, 131:861-72 (2007); Park et al, Nature 451:141-146 (2008); Yu et al, Science 318: 1917- 20; Zhu *et al.*, Cell Stem Cell 2010, 7:651-5; 및 Li *et al.*, Cell Res. 2011, 21:196-204; Malik and Rao, Methods Mol Biol. 2013;997:23-33; Okano et al, Circ Res. 2013 Feb 1; 112(3):523-33; Lin and Ying, Methods Mol Biol. 2013, 936:295-312를 *참조*하라. 말초 혈액 유래 단핵 세포는 환자 혈액 샘플로부터 단리하고, 유도된 전분화능 줄기세포를 생성하는 데 사용될 수 있다. 다른 예에서, 유도된 전분화능 줄기세포는 소분자, 예컨대 형질전환 성장 인자 β(SB431542), MEK/ERK(PD0325901) 및 Rho-키나제 신호전달(티아조비빈)과 함께 Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC의 높은 공동-발현을 위해 최적화된 구성물로 재프로그래밍함으로써 수득될 수 있다. GroB *et al.*, Curr Mol Med. 2013, 13:765-76 and Hou *et al.*, Science 2013, 341:651-4를 *참조*하라. 줄기세포로부터 내피 세포를 생성하는 방법은 Reed *et al.*, Br J Clin Pharmacol. 2013, 75(4):897-906에서 검토된다. 제대혈 줄기세포는 신선하거나 동결된 제대혈로부터 단리될 수 있다. 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 정제되지 않은 미가공 골수 또는 피콜-정제 골수로부터 단리될 수 있다. 상피 및 내피 세포는 당업계에 알려진 방법에 따라, 살아있거나 사체의 기증자, *예를 들어* 생체인공 신장 또는 폐를 제공 받을 대상체로부터 단리 및 수집될 수 있다. 예를 들어, 상피 세포는 피부 조직 샘플(*예를 들어*, 펀치 생검)으로부터 수득될 수 있고, 내피 세포는 혈관 조직 샘플로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질분해 효소는 맥관구조에 위치된 카테터를 통해 조직 샘플 내로 관류된다. 효소적으로 처리된 조직의 일부는 추가로 효소 및 기계적인 파괴를 겪을 수 있다. 이러한 방식으로 수득된 세포의 혼합물을 분리하여 상피 및 내피 세포를 정제할 수 있다. 경우에 따라, 유세포 분석 기반 방법(*예를 들어,* 형광 활성화 세포 분류)을 사용하여, 특정 세포 표면 마커의 존재 또는 부재에 따라 세포를 분류할 수 있다. 또한, 신장 또는 폐 세포(*예를 들어*, 상피, 중간엽 및 내피)는 신장 또는 폐 생검으로부터 수득될 수 있으며, 예를 들어, 기관지 및 기관지내 생검을 통해 또는 신장 또는 폐 조직의 외과적 생검을 통해 수득될 수 있다. 비-자가유래 세포가 사용되는 경우, 대상체로 이식될 때 장기 또는 조직이 거부되지 않도록, 면역 종류-일치된 세포의 선택이 고려되어야 한다.

[0163] 일부 경우에, 본원에 제공된 바와 같은, 탈세포화 또는 인공 신장 또는 폐 조직 바탕질은 관류 시딩에 의해 세포 유형로 시딩될 수 있다. 예를 들어, 유동 관류 시스템을 이용하여 조직 바탕질에 보존된 혈관 시스템을 통해 (*예를 들어*, 동맥 라인을 통해) 탈세포화된 신장 또는 폐 조직 비탕질을 시딩할 수 있다. 일부 경우에, 적절한 조건에서 자동화된 유동 관류 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 관류 시딩 방법은 시딩 효율을 향상시키고, 조성물 전반에 보다 균일한 세포 분포를 제공할 수 있다. 정량적 생화학 및 이미지 분석 기술을 사용하여 정적 또는 관류 시딩 방법 후 시딩된 세포의 분포를 평가할 수 있다.

[0164] 일부 경우에, 조직 바탕질은 시딩된 재생세포의 분화를 자극하기 위해 하나 이상의 성장 인자로 함침될 수 있다. 예를 들어, 조직 바탕질은 본원에 제공된 방법 및 물질에 적합한 성장 인자, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자(VEGF), TGF-β 성장 인자, 골 형태형성 단백질(*예를 들어*, BMP-1, BMP- 4), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(b-FGF), *예를 들어*, FGF-10, 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 표피 성장 인자(EGF) 또는 성장 분화 인자-5(GDF-5)로 함침될 수 있다. *예를 들어*, Desai and Cardoso, Respire. Res. 2002, 3:2를 *참조*하라. 이러한 성장 인자는 일시적인 방출을 제어하기 위해 캡슐화될 수 있다. 스캐폴드의 다른 부분은 성장 인자 자극의 공간 제어를 추가하기 위해 다른 성장 인자로 증진될 수 있다. 일부 경우에, 조직 바탕질은 재생세포의 부착 및 성장을 지원하기 위해 재생세포의 시딩 전에, 세포외 바탕질 구성요소(*예를 들어*, 라미닌, 피브로넥틴, 콜라겐, 엘라스틴)으로 함침될 수 있다. 일부 경우에, 조직 바탕질은 재생세포의 대사, 부착 및 생존력을 지원하기 위해 재생 세포의 시딩 전에, 단리된 미토콘드리아로 함침될 수 있다.

[0165] 시딩된 조직 바탕질은 조직 바탕질에서 세포의 고정 및 침투를 향상시키기 위해 시딩 후 일정 기간(*예를 들어*, 수 시간 내지 약 14일 이상) 동안 항온처리될 수 있다. 시딩된 조직 바탕질은 재생세포의 적어도 일부가 무세포 조직 바탕질 내에서 그리고 무세포 조직 바탕질 상에서 증식 및/또는 분화할 수 있는 조건 하에 유지될 수 있다. 상기 조건은, 비제한적으로, 적절한 온도(섭씨 35-38도) 및/또는 압력(*예를 들어*, 대기압), 전기적 및/또는 기계적 활성(*예를 들어,* 1-20 cmH_2O의 호기종말양압호흡, 5-50 cmH_2O의 평균 기도 압력 및 5-65cmH_2O의 최대 흡기압으로 정압 또는 부압을 *통한* 환기), 적절한 양의 유체, *예를 들어,* O_2(1-100% FiO_2) 및/또는 CO_2(0-10%

$FiCO_2$), 적절한 양의 습도(10-100%) 및 멸균 또는 거의 멸균 조건을 포함할 수 있다. 상기 조건은 또한, 습식 환기, 습식 대 건식 환기 및 건식 환기를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 영양 보충제(*예를 들어*, 영양소 및/또는 탄소원, 예컨대 포도당), 외인성 호르몬 또는 성장 인자가 시딩된 조직 바탕질에 추가될 수 있다. 조직학 및 세포 염색을 수행하여 시딩된 세포 증식에 대해 검정할 수 있다. 임의의 적절한 방법을 수행하여 시딩된 세포 분화에 대해 검정할 수 있다.

[0166] 따라서, 본원에 기재된 방법은 이식가능한 생체인공 장기 또는 조직, *예를 들어* 인간 대상체로 이식하기 위한 인공 신장 또는 폐를 생성하는 데 사용될 수 있다. 이식가능한 장기 또는 조직은 환자의 혈관계에 연결될 수 있는 충분히 온전한 맥관구조를 바람직하게 유지할 것이다.

[0167] **IV. 대상체를 치료하는 방법**

[0168] 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아로 전처리되어 있는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포, 또는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포로부터 단리된 세포외 소포를 포함하는 약학 조성물을 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체 또는 기증자 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체 또는 기증자 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 폐 기도를 통해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사(*예를 들어*, 정맥내, 피하, 복강내 및 근육내 주사)에 의해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0169] 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제의 비제한적인 예는 호흡 완충액(*예를 들어*, 수크로스, 글루타메이트, 말레이트, 석시네이트 및 ADP를 함유하는 완충액); 세포외 바탕질 구성요소(*예를 들어*, 라미닌, 피브로넥틴, 콜라겐, 엘라스틴); 장기 또는 조직 보존 용액(*예를 들어*, 유로-콜린스(Euro-Collins) 용액); 등장성 식염수; 물; 평형 염류 용액; 수용성 덱스트로스; 폴리올(*예를 들어*, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등); 및 식물성 오일이다. 당업자는 참조 편람 "Handbook of Pharmaceutical Excipients"(미국 제약 협회(American Pharmaceutical Association), 파마슈티컬 프레스(Pharmaceutical Press); 2009년 6차 개정판)을 참조할 수 있다. 더욱이, 당업자는 주사 또는 흡입용으로 의도된 조성물의 제조에 맞게 조정된 것으로 알려진 약학적 용도를 위한 담체 또는 부형제로부터 담체 또는 부형제를 선택할 수 있다. 주사 용도에 적합한 약학적 형태는 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우에서, 상기 형태는 용이한 주사기 기능성이 존재하는 정도로 유동적일 수 있다. 필요한 경우, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등의 다양한 항박테리아 및 항진균제가 사용될 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들어 설탕 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다.

[0170] 활성 성분의 비제한적인 예는 트레프로스티닐, 항산화제, 항히스타민제, 면역조절제, 생물학적 첨가제, 진통제, 마취제, 항생제, 항진균제, 유넥스-42 및 항염증제이다. 특정 실시양태에서, 활성 성분은 약학적 활성 성분이고 치료 효과를 발현한다.

[0171] 또한, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (A) 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포 또는 중간엽 줄기세포 또는 내피 프로제니터 세포로부터 단리된 세포외 소포 및 (B) 단리된 미토콘드리아를 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 (A) 및 (B)는 단일 약학 조성물 또는 두 개의 개별 약학 조성물에 포함된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체 또는 기증자 폐에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체 또는 기증자 폐에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 폐 기도를 통해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사(*예를 들어*, 정맥내, 피하, 복강내, 근육내)에 의해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0172] 또한, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계, 및 (ii) 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 조성물은, 폐 질환 또는 장애의 치료용 약물의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0173] 폐 질환 및 장애의 비제한적인 예는 폐 고혈압, 기관지폐형성이상(BPD), 폐 섬유증, 천식, 수면호흡장애 또는 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)이다.

[0174] 폐 고혈압의 비제한적인 예는 COPD로 인한 폐 고혈압, 만성 혈전색전성 폐 고혈압(CTEPH), 폐동맥고혈압(PAH), 폐 정맥 폐쇄증(PVOD), 폐 모세혈관 혈관종증(PCH), 신생아의 유지성 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압이다.

[0175] 폐 질환 또는 장애, 예컨대 폐 고혈압을 치료하기 위한 약물의 비제한적인 예는 트레프로스티닐, 에포프로스테놀, 일로프로스트, 보센탄, 암브리센탄, 마시텐탄 및 실데나필이다.

[0176] 또한, 본원은 폐 고혈압의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 고혈압을 치료하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계, 및 (ii) 트레프로스티닐을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 조성물은, 트레프로스티닐의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물이 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0177] 유넥스-42는 인간 중간엽 줄기세포로부터 분비된 세포외 소포의 제제이다. 본원은 또한 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 폐 질환 또는 장애를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계, 및 (ii) 유넥스-42를 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 조성물은 유넥스-42의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 폐 기도를 통해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0178] 또한, 본원은 폐 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하거나, 이식 전 또는 이식 후에 기증자 폐의 기능을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계, 및 (ii) 항산화제를 치료적 유효량으로 대상체 또는 기증자 폐에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 조성물은 항산화제의 투여 전, 이와 동시에 또는 그 후에 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 항산화제는 n-아세틸시스테인, 템폴 또는 레스베라트롤이다. 일부 실시양태에서, 항산화제는 단리된 미토

콘드리아를 포함하는 조성물의 일부로서 이와 동시에 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 폐 기도를 통해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 대상체 또는 기증자 폐에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0179] 본원은 또한, 대상체에서 폐 질환 또는 장애의 급성악화를 치료하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 구제 요법을 위해 대상체에게 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 폐 질환 또는 장애는 폐 고혈압, 천식, 수면호흡장애, BPD, COPD 또는 폐 섬유증이다. 일부 실시양태에서, 폐 고혈압은 신생아의 폐 고혈압, BPD-유도 폐 고혈압, 좌심실 질환에 대한 속발성 폐 고혈압, 폐 질환, 만성 저산소증, 만성 동맥 폐색으로 인한 폐 고혈압 또는 불분명하거나 다인성의 메커니즘을 갖는 폐 고혈압이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0180] 또한, 본원은 급성 신손상의 치료를 필요로 하는 대상체에서 급성 신손상을 치료하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 치료적 유효량으로 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계는 대상체에서 하나 이상의 전염증성 사이토카인 또는 전염증성 매개체의 혈청 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 전염증성 사이토카인 또는 전염증성 매개체는 단핵구 주화인자 단백질 1(MCP1), C3A 및 C5a로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계는 대상체에서 신손상 분자-1(KIM1) 혈청 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계는 대상체에서 혈중요소질소(BUN) 수준을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계는 대상체에서 신장 중량을 감소시킨다.

[0181] 또한, 본원은 심정지 상태에 있거나 소생법을 받고 있는 대상체를 치료하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 포함하는 조성물을 유효량으로 대상체에 투여하여 의료시설로의 수송 또는 의학적 치료를 용이하게 하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 흡입에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물이 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0182] 본원은 또한, 염증 감소를 필요로 하는 대상체에서 염증을 감소시키는 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 대상체로부터 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조혈 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0183] 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 전에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 조혈 계통 세포로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 후에, 적어도 하나의 이종성 단백질을

인코딩하는 이식유전자를 단리된 조혈 계통 세포로 도입하는 단계를 추가로 포함한다.

[0184] 일부 실시양태에서, 단리된 조혈 계통 세포는 골수 세포, 골수 전구세포 또는 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 조혈 계통 세포는 대상체의 말초 혈액으로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 말초 혈액으로부터 조혈 계통 세포를 단리하기 전에 줄기세포 동원 작용제(mobilizing agent)로 처리되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 줄기세포 동원 작용제는 과립구-집락 자극인자(G-CSF)이다. 다른 실시양태에서, 조혈 계통 세포는 대상체의 골수로부터 단리된다.

[0185] 대상체의 혈액 또는 장기 조직으로부터 세포 서브셋을 단리 및 농축시키는 기술은 당업계에 알려져 있고, 유세포 분석, 밀도 원심분리 및 자기 단리(magnetic isolation)와 같은 기술을 포함한다(*예를 들어*, Salvagno, C. and de Visser, K.E., Methods Mol Biol. 2016; 1458:125-35를 *참조*하고, 이의 전체 내용은 참조로 포함됨).

[0186] 증폭/발현 방법, 면역조직화학 방법, FISH 및 셰드 항원(shed antigen) 검정, 서던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅 또는 PCR 기술과 같은, 단백질(*예를 들어*, 재조합 단백질)의 수준 및 활성을 결정하기 위한 다양한 검정이 이용가능하다. 더욱이, 단백질 발현 또는 증폭은, 생체내 진단 검정 사용, *예를 들어*, 검출될 단백질에 결합하고 검출가능한 표지(*예를 들어*, 방사성 동위원소)로 태깅된 분자(예컨대, 항체)를 투여하고, 표지의 위치에 대해 환자를 외부에서 스캔함으로써 평가될 수 있다. 따라서, 세포에서 단백질 수준의 수준을 측정하는 방법은 일반적으로 당업계에 알려져 있고, 이를 이용하여 경우에 따라 본원에 제공된 방법 및 조성물과 연계하여 단백질 수준 및/또는 활성을 평가할 수 있다. 이러한 검정을 이용하여, 이식유전자에 의해 인코딩된 재조합 단백질로의 변형의 효과를 결정할 수 있다. 예를 들어, 이러한 검정을 사용하여, 변형이 정상 수준 또는 완전한 기능의 유전자 산물을 생성할 수 없는 이식유전자를 초래하는지 여부를 결정하거나, 재조합 단백질의 전부 또는 일부의 돌연변이를 포함하는 이식유전자를 확인할 수 있다.

[0187] 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 전에, 단리된 조혈 계통 세포를 *생체외*에서 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 조혈 계통 세포에 전달하는 단계 후에, 단리된 조혈 계통 세포를 *생체외*에서 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 조혈 계통 세포는 M1 또는 M2 표현형을 갖는 대식세포로 *생체외*에서 분화된다.

[0188] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조혈 계통 세포에 비해, 감소된 NF-κB의 발현을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 조혈 계통 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 조혈 계통 세포에 비해, 전-염증성 사이토카인 및 케모카인, 예컨대 MIP-1β(CCL4), PDGF-BB, 란테스(CCL5), 가용성 ICAM-1(sICAM-1), M-CSF(CSF-1), IL-1β, IL-6, IL-8(CXCL8), GDF-15, TGF-β1 또는 이들의 임의의 조합의 감소된 분비를 갖는다.

[0189] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 단리된 조혈 계통 세포는 주사에 의해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 단리된 조혈 계통 세포는 마이크로캐리어의 일부로서 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 마이크로캐리어는 바람직하게는 세포외 구성요소를 갖는 바탕질에 코팅된다. 일부 실시양태에서, 마이크로캐리어는 양전하로 하전된다.

[0190] 골수 세포 또는 골수 전구세포의 비제한적인 예는 단핵구, 대식세포, 호중구, 조혈모세포 및 골수성 프로제니터 세포이다.

[0191] **V. 장기, 조직, 사지 또는 다른 신체 일부를 보존하는 방법**

[0192] 본원은 운송 및 이식을 위해 조직 또는 장기를 보존하는 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 운송 및 이식을 위해 의도된 조직 또는 장기에 전달하는 단계를 포함하고, 여기서 조직 또는 장기는 사망한 기증자로부터 입수된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 사망한 기증자에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 사망한 기증자에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다.

[0193] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자의 죽음 후 24시간 이내에 조직 또는 장기에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자의 죽음 후 12시간 이내에 조직 또는 장기에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기증자의 죽음 후 4시간 이내에 조직 또는 장기에 전달된다.

[0194] 일부 실시양태에서, 방법은 사망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 적출함으로써 가망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 입수하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 사망한 기증자로부터

조직 또는 장기를 적출하기 전에 조직 또는 장기에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 사망한 기증자로부터 조직 또는 장기를 적출한 후에 조직 또는 장기에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 주사에 의해 조직 또는 장기에 전달된다. 일부 실시양태에서, 조직 또는 장기는 심장, 간, 폐, 혈관, 요관, 기관, 피부 패치 또는 신장이다. 바람직한 실시양태에서, 조직 또는 장기는 인간 조직 또는 장기이다.

[0195] 바람직한 실시양태에서, 조직 또는 장기는 폐이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 기도, 정맥내 또는 동맥내로 폐에 전달된다. 다른 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 EVLP 중 폐에 전달된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 폐는 인간 폐이다. 다른 바람직한 실시양태에서, 조직 또는 장기는 신장이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 정맥내 또는 동맥내로 신장에 전달된다.

[0196] 또한, 본원은 외상성 절단으로 인해 손실된 사지 또는 다른 신체 일부를 보존하는 방법을 개시하고, 상기 방법은 사지 또는 다른 신체 일부의 외상성 절단 후, 단리된 미토콘드리아를 사지 또는 다른 신체 일부에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 사지 또는 다른 신체 일부에 대해 동종이계의 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 사지 또는 다른 신체 일부에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는, 외상성 절단 후 늦어도 15분, 30분, 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 또는 24시간까지, 절단된 사지 또는 다른 신체 일부에 전달된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 주사에 의해 절단된 사지 또는 다른 신체 일부에 전달된다. 바람직한 실시양태에서, 사지 또는 다른 신체 일부는 인간 사지 또는 다른 신체 일부이다.

[0197] **VI. 세포 기능 및 세포 요법을 향상시키는 방법**

[0198] 본원은 단리된 세포의 세포 기능을 향상시키는 방법을 개시하고, 상기 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 세포에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다.

[0199] 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 인간 세포이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 면역세포(*예를 들어,* 조혈 계통 세포), 중간엽세포, 주피세포 및 이들의 임의의 조합이다.

[0200] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해 증가된 세포외 소포 분비를 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 변경된 세포외 소포 조성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 변경된 세포외 소포 조성은 단백질 함량, 핵산 함량, 지질 함량 또는 이들의 임의의 조합의 측면에서 변경된다.

[0201] 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 전에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 후에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포로 도입하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이종성 단백질은 세포외 소포의 세포로부터 분비된다.

[0202] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 자가포식, 감소된 마이토파지, 감소된 노화, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 세포 손상, 감소된 세포 염증, 감소된 활성산소종 생성, 증가된 세포 장벽 기능, 증가된 혈관신생, 증가된 세포 부착, 증가된 성장 동역학 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바

람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1, MCL-1 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 발현과 관련된다.

[0203] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 발현과 관련된다.

[0204] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체에서 향상된 세포 부착 및 성장 동역학을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 마이크로캐리어이다. 일부 실시양태에서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함한다.

[0205] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포보다 저온 허혈 또는 저온 보관에서 생존력을 더 오래 유지한다.

[0206] 단리된 세포의 비제한적인 예는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포(*예를 들어,* 조혈 계통 세포), 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 및 이들의 임의의 조합이다.

[0207] 또한, 본원은 세포 요법을 필요로 하는 대상체에서 세포 요법을 향상시키는 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 시험관내에서 전달하는 단계, 및 (ii) 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 대상체에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 *시험관내*에서 전달하는 단계 전에, 대상체로부터 자가유래 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0208] 일부 실시양태에서, 단리된 세포는 동종이계 세포이다. 다른 실시양태에서, 단리된 세포는 자가유래 세포이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 인간 세포이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포(*예를 들어,* 조혈 계통 세포), 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0209] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 세포외 소포 분비를 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 변경된 세포외 소포 조성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 변경된 세포외 소포 조성은 단백질 함량, 핵산 함량, 지질 함량 또는 이들의 임의의 조합의 측면에서 변경된다.

[0210] 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 전에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계 후에, 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 단리된 세포로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이종성 단백질은 세포외 소포의 세포로부터 분비된다.

[0211] 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 주사에 의해 대상체에 투여된다. 다른 실시양태에서,

단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 기도를 통해 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 마이크로캐리어의 일부로서 대상체에 투여된다.

[0212] 일부 실시양태에서, 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 자가포식, 감소된 마이토파지, 감소된 노화, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성, 감소된 세포 손상, 감소된 세포 염증, 증가된 세포 장벽 기능, 증가된 혈관신생, 증가된 세포 부착, 증가된 성장 동역학 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1, MCL-1 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 발현과 관련된다.

[0213] 일부 실시양태에서, 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 80% 증가된 발현과 관련된다.

[0214] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체에서 향상된 세포 부착 및 성장 동역학을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 마이크로캐리어이다. 일부 실시양태에서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함한다.

[0215] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포보다 저온 허혈에서 생존력을 더 오래 유지한다.

[0216] **VII. 단리된 세포의 저온 운송, 수송 및 보관을 향상시키기 위한 방법**

[0217] 본원은 또한, 단리된 세포의 저온 운송, 저온 수송 또는 저온 보관을 향상시키기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 저온 운송, 저온 수송 또는 저온 보관 전, 도중 또는 그 후에 단리된 미토콘드리아를 단리된 세포에 전달하는 단계를 포함하고, 여기서 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포의 세포에 비해, 생존력의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 세포에 대해 동종이계의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 세포에 대해 자가유래의 단리된 인간 미토콘드리아이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포의 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 향상을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 인간 세포이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 면역세포(*예를 들어,* 조혈 계통 세포), 중간엽세포 또는 주피세포이다.

[0218] 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 단리된 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 세포에 비해, 감소된 ROS-매개 산화 부산물의 생성, 향상된 세포 생존력, 감소된 괴사, 감소된 세포 용해, 증가된 세포 ATP의 총 수준, 감소된 염증성 사이토카인 분비 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 염증성 사이토카인은 IL-6, IL-8 및 IFN-γ를 포함한다. 일부 실시양태에서, ROS-매개 산화 부산물은 4-HNE 및 8-OHdG를 포함한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 방법은 단리된 미토콘드리아로 처리된 인간 세포를 동결보존하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 인간 세포는 점감적인 액체 N_2 동결에 의해

동결보존된다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 지질, 단백질, 당류, 올리고당, 다당류 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 용액에서 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아로 처리된 세포는 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 플라스마라이트, 크라이오스토르, 디메틸 설폭사이드, 지질, 글루타메이트, PEG, PVA, 알부민 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 용액에서 유지된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 용액에 존재한다. 단리된 미토콘드리아는 인간 세포를 동결보존하는 단계 전, 인간 세포를 동결보존하는 단계 중, 동결보존으로부터 해동 시 또는 이들의 임의의 조합에서, 인간 세포에 전달될 수 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, 단리된 세포는 동종이계 세포이다. 다른 실시양태에서, 단리된 세포는 자가유래 세포이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 인간 세포이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 단리된 세포는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포(*예를 들어,* 조혈 계통 세포), 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0221] **VIII. 단리된 미토콘드리아의 보존 방법**

[0222] 본원은 단리된 미토콘드리아, 예컨대 돼지 미토콘드리아를 동결보존하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 동결보호제를 포함하는 동결 완충액에서 단리된 미토콘드리아를 동결시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 또는 조직으로부터 미토콘드리아를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결보호제는 지질, 단백질, 당류, 이당류, 올리고당류, 다당류 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 등장성 완충액을 사용하여 생리적 pH로 보관되고, 선택적으로 폴리펩티드, 단백질 또는 미토콘드리아 막 무결성을 보존하기 위한 다른 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 저온 보관 완충액은 7.0 내지 7.5의 pH, 예컨대 약 7.2, 7.35 또는 7.4의 pH를 가질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 동결보호제는 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 플라스마라이트, 크라이오스토르, DMSO, 글루타메이트, PEG, PVA, 알부민 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 점감적인 액체 N_2 동결에 의해 동결보존된다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 또는 다른 동결보호제는 100-500 mM, 200-400 mM, 250-350 mM 또는 275-325 mM의 양으로 존재할 수 있다. 미토콘드리아는 -20℃ 이하, -40℃ 이하, -60℃ 이하, -70℃ 이하 또는 -80℃ 이하의 온도에서 유지될 수 있다.

[0223] 일부 실시양태에서, 방법은 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및 미토콘드리아 스웰링, 미토콘드리아 막 전위 공극(mPTP) 개방, 미토콘드리아 호흡, 미토콘드리아 막 전위, 완전 미토콘드리아 투과성 및 미토콘드리아 스웰링 중 하나 이상을 측정함으로써 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강 및/또는 기능을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 미토콘드리아는 돼지미토콘드리아이다. 다른 실시양태에서, 방법은 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및 전체 미토콘드리아 몰폴로지를 채점하고/하거나 평균 미토콘드리아 크기를 측정함으로써, 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강 및/또는 기능을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 해동시킨 단리된 미토콘드리아는, 예컨대 건강하고/하거나 기능적인 미토콘드리아를 단리하기 위해 유세포 분석과 같은 기술을 사용하여 사전-정의된 기준에 따라 분류될 수 있다.

[0224] 본원은 또한, 단리된 미토콘드리아, 예컨대 돼지 미토콘드리아를 장기간 보관하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 (i) 세포 또는 조직으로부터 미토콘드리아를 단리하는 단계, (ii) 단리된 미토콘드리아를 저온 보관 완충액에 현탁시키는단계, (iii) 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 저온 보관 완충액 중 단리된 미토콘드리아를 동결시키는 단계, 및 (iv) 24시간 이상 동안에 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 단리된 미토콘드리아는 단리된 인간 미토콘드리아이다.

[0225] 일부 실시양태에서, 방법은 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 저온 보관 완충액 중 단리된 미토콘드리아를 동결시키는 단계, 및 약 -70℃ 내지 약 -100℃의 온도에서 24시간 이상 동안 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 유지하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 저온 보관 완충액 중 단리된 미토콘드리아는 약 -75℃ 내지 약 -95℃의 온도에서 동결되고, 동결시킨 단리된 미토콘드리아는 약 -75℃ 내지 약 -95℃의 온도에서 유지된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 저온 보관 완충액 중 단리된 미토콘드리아는 약 -80℃ 내지 약 -90℃의 온도에서 동결되고, 동결시킨 단리된 미토콘드리아는 약 -80℃ 내지 약 -90℃의 온도에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 저온 보관 완충액은 트레할로스, 수크로스, 글리세롤, 크라이오스토르 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 바

람직한 실시양태에서, 저온 보관 완충액은 등장성이고, 약 7.0 내지 약 7.5의 pH를 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 저온 보관 완충액은 등장성이고, 약 7.2의 pH를 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 저온 보관 완충액은 트레할로스를 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 저온 보관 완충액은 300 mM의 트레할로스, 10 mM의 HEPES, 10 mM의 KCl, 1 mM의 EGTA, 0.1%의 지방산-미포함 BSA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결시킨 단리된 미토콘드리아는 1주 이상 동안 상기 온도에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 동결시킨 단리된 미토콘드리아는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 1 년 이상 동안 상기 온도에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 방법은 (v) 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및 (vi) 미토콘드리아 스웰링, 미토콘드리아 막 전위 공극(mPTP) 개방, 미토콘드리아 호흡, 미토콘드리아 막 전위, 완전 미토콘드리아 투과성 및 미토콘드리아 스웰링 중 하나 이상을 평가함으로써 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강 및/또는 기능을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 (v) 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, (vi) 유세포 분석을 이용하여 미토콘드리아 스웰링을 측정함으로써 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강을 평가하는 단계, 및 (vii) 유세포 분석-평가된 세포 분류를 이용하여 스웰링 표현형을 갖는 미토콘드리아로부터 건강한 미토콘드리아를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 방법은 (v) 동결시킨 단리된 미토콘드리아를 해동하는 단계, 및 (vi) 전체 미토콘드리아 몰폴로지를 채점하고/하거나 평균 미토콘드리아 크기를 측정함으로써, 해동시킨 단리된 미토콘드리아의 건강을 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 바람직한 실시양태에서, 미토콘드리아는 돼지 미토콘드리아이다.

[0226] **IX. 인간 세포에서 돼지 미토콘드리아를 검출하기 위한 방법**

[0227] 본원은 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 돼지 미토콘드리아를 검출하기 위한 방법을 개시하고, 상기 방법은 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 핵산 마커의 존재를 *시험관내* 또는 *생체외* 검출하는 단계를 포함하고, 여기서 핵산 마커는 미토콘드리아 DNA 또는 RNA의 서열을 포함하고, 핵산 마커는 돼지 미토콘드리아에 존재하고 인간 미토콘드리아에 부재하다. 바람직한 실시양태에서, 방법은 인간 세포, 조직 또는 장기 샘플에서 핵산 마커의 양을 정량화하는 단계를 추가로 포함한다.

[0228] 일부 실시양태에서, 방법은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 핵산 마커를 증폭시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 마커의 존재는 프라이머 쌍을 사용하는 PCR에 의해 검출되고, 여기서 프라이머 쌍의 프라이머 중 적어도 하나는 핵산 마커에 특이적으로 하이브리드화한다. 다른 실시양태에서, 핵산 마커의 존재는 핵산 마커에 특이적으로 하이브리드화하는 핵산 프로브를 사용하여 검출된다.

[0229] **X. 외인성 미토콘드리아를 갖는 인간 세포를 포함하는 조성물**

[0230] 본원은 인간 세포를 포함하는 조성물을 개시하고, 여기서 인간 세포의 사이토솔은 외인성 미토콘드리아를 포함하고, 조성물의 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 미토콘드리아 기능의 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100%의 향상을 갖고, 향상된 미토콘드리아 기능은 적어도 1% 또는 적어도 2% 또는 적어도 5% 또는 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 50% 또는 적어도 100% 증가된 산소 소모 및/또는 증가된 ATP 합성이다. 일부 실시양태에서, 외인성 미토콘드리아는 돼지 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 외인성 미토콘드리아는 인간 세포에 대해 동종이계의 인간 미토콘드리아이다. 일부 실시양태에서, 외인성 미토콘드리아는 돼지 심장으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간 세포는 상피 세포(*예를 들어,* I형 폐포 세포, II형 폐포 세포, 소기도 및 대기도 상피 세포), 내피 세포(*예를 들어,* 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)), 섬유아세포, 프로제니터 세포(*예를 들어,* 내피 프로제니터 세포 및 중간엽 줄기세포), 민무늬근세포(*예를 들어,* 폐 동맥 민무늬근세포), 골격근세포, 심장근육세포, 간세포, 면역세포(*예를 들어,* 조혈 계통 세포), 중간엽세포, 주피세포, 뉴런세포 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0231] 일부 실시양태에서, 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 증가된 세포외 소포 분비를 갖는다. 일부 실시양태에서, 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 변경된 세포외 소포 조성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 변경된 세포외 소포 조성은 단백질 함량, 핵산 함량, 지질 함량 또는 이들의 임의의 조합의 측면에서 변경된다.

[0232] 일부 실시양태에서, 인간 세포는 적어도 하나의 이종성 단백질을 인코딩하는 이식유전자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 이식유전자의 전사는 인간 세포의 핵에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 이식유전자는 인간 세포의 핵 DNA에서 안정적으로 통합된다. 바람직한 실시양태에서, 이종성 단백질은 세포외 소포의 인간 세포로부터 분비된다. 다른 실시양태에서, 이식유전자의 전사는 외인성 미토콘드리아에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 이식유전자는 외인성 미토콘드리아의 미토콘드리아 DNA(mtDNA)에서 안정적으로 통합된다.

[0233] 바람직한 실시양태에서, 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포보다 저온 허혈 또는 저온 보관에서 생존력을 더 오래 유지한다.

[0234] 바람직한 실시양태에서, 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 자가포식, 감소된 마이토파지, 감소된 노화, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달, 감소된 활성산소종 생성, 감소된 세포 염증, 감소된 세포 손상, 증가된 세포 부착, 증가된 세포 장벽 기능, 증가된 혈관신생, 증가된 성장 동역학 또는 이들의 임의의 조합을 갖는다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포 손상은 감소된 TLR9 발현, 변경된 HO-1 발현, 감소된 사이토솔 mtDNA 또는 이들의 임의의 조합과 관련된다. 일부 실시양태에서, 변경된 HO-1 발현은 저온 노출 후, 증가된 HO-1 발현이다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살, 증가된 세포 생존력, 감소된 미토콘드리아 스트레스 신호전달 및/또는 감소된 세포 손상은, 감소된 NF-κB, MAPK14, JNK, p53 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 감소된 전-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 전-세포자살 억제제(BIM, PUMA), 전-세포자살 이펙터(BAX, BAK), 아포프토제닉 인자(SMAC, DIABLO, BID, BAD 등) 또는 이들의 임의의 조합의 감소된 발현과 관련된다. 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 증가된 항-세포자살 마커 발현과 관련된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 감소된 세포의 세포자살은 BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1/BFL-1, MCL-1 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 발현과 관련된다.

[0235] 일부 실시양태에서, 인간 세포는 외인성 미토콘드리아로 처리되지 않은 상응하는 인간 세포에 비해, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 증가된 포도당 흡수 및 감소된 락테이트 생성은 HK, VDAC1, GLUT, AKT1 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 발현과 관련된다.

[0236] 바람직한 실시양태에서, 인간 세포는 외인성 미토콘드리아가 결여된 상응하는 인간 세포에 비해, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체에서 향상된 세포 부착 및 성장 동역학을 갖는다. 일부 실시양태에서, 조성물은 이차원 또는 삼차원 세포 지지체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 마이크로캐리어이다. 일부 실시양태에서, 이차원 또는 삼차원 세포 지지체는 하나 이상의 세포외 바탕질 구성요소를 포함한다.

[0237] 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 추가로 포함한다.

[0238] 본원에 기재된 단리된 폴리펩티드 및 재조합 단백질은 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은, 직접적인 단백질 합성 방법에서, 단리된 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 DNA 서열을 구성하고 적합한 형질전환된 숙주에서 이러한 서열을 발현시키는 것에 이르기까지 다양하다. 일부 실시양태에서, DNA 서열은 관심 야생형 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 단리 또는 합성함으로써 재조합 기술을 사용하여 구성된다. 선택적으로, 서열은 사이트-특이적 돌연변이유발에 의해 돌연변이화되어 이의 기능적 유사체를 제공할 수 있다. *예를 들어*, Mark, D.F., *et al*., Proc Natl Acad Sci USA. 1984 Sep;81(18):5662-6 및 미국 특허 번호 4,588,585를 *참조*하라(그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0239] 하나 이상의 관심 폴리펩티드(*예를 들어*, 재조합 단백질)를 인코딩하는 DNA 서열(*예를 들어*, 이식유전자)은 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하는 화학적 합성에 의해 구성될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는, 원하는 폴리펩티드의 아미노산 서열에 기반하고, 관심 폴리펩티드가 생성될 숙주 세포에 선호되는 코돈을 선택하여 디자인될 수 있다. 표준 방법은, 단리된 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 합성하는 데 적용될 수 있다. 예를 들어, 완전 아미노산 서열을 사용하여 역-번역된 유전자를 구성할 수 있다. 또한, 특정 단리된 폴리펩티드에 대해 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 올리고머가 합성될 수 있다. 예를 들어, 원하는 폴리펩티드의 일부에 대해 코딩하는 여러 개의 작은 올리고뉴클레오티드는 합성된 후, 결찰될 수 있다. 개별 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 상보적 조립을 위한 5' 또는 3' 돌출부(overhang)를 함유한다.

[0240] (합성, 사이트-지정 돌연변이유발 또는 또 다른 방법에 의해) 일단 조립되면, 특정 단리된 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 벡터로 삽입되고, 원하는 숙주에서 단백질의 발현에 적합한 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 것이다. 적절한 조립은 뉴클레오티드 시퀀싱, 제한 매핑(mapping) 및 적절한 숙주에서 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 발현에 의해 확인될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, 숙주에서 형질전환된 유전자의 높은 발현 수준을 얻기 위해, 유전자는 선택된 발현 숙주에서 기능적인 전사 및 번역 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0241] 특정 실시양태에서, 재조합 발현 벡터는 하나 이상의 관심 폴리펩티드(*예를 들어*, 재조합 단백질)를 인코딩하는 DNA(*예를 들어*, 이식유전자)를 증폭하고 발현하는 데 사용된다. 재조합 발현 벡터는 포유류, 미생물, 바이러스

또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결된, 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 합성 또는 cDNA-유래 DNA 단편을 갖는 복제가능한 DNA 구성물이다. 전사 유닛은 일반적으로 (1) 유전자 발현에서 조절 역할을 갖는 유전 요소 또는 요소들, 예를 들어 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조적 또는 코딩 서열 및 (3) 이하에 상세히 기재된 바와 같이, 적절한 전사 및 번역 개시 및 종결 서열의 조립을 포함한다. 이러한 조절 요소는 전사를 제어하기 위한 오퍼레이터 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 복제 기점에 의해 부여되는 숙주에서의 복제 능력 및 형질전환체의 인식을 용이하게 하는 선택 유전자가 추가적으로 포함될 수 있다. DNA 영역은 기능적으로 서로 관련되어 있을 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 신호 펩티드(분비 리더)를 위한 DNA가 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우, 이는 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동가능하게 연결되거나; 프로모터가 서열의 전사를 조절하는 경우, 이는 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 리보솜 결합 사이트가 번역을 허용하도록 위치되는 경우, 이는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 효모 발현 시스템에 사용하기 위해 의도된 구조적 요소들은 숙주 세포에 의해 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능하게 하는 리더 서열을 포함한다. 대안적으로, 재조합 단백질이 리더 또는 수송 서열 없이 발현되는 경우, N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 잔기는 발현된 재조합 단백질로부터 후속적으로 절단되어 최종 산물을 제공할 수 있다.

[0242] 발현 조절 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 의존할 것이다. 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 사용될 수 있다. 진핵 숙주에 유용한 발현 벡터는, 예를 들어, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 거대세포바이러스 유래의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 박테리아 숙주에 유용한 발현 벡터는 알려진 박테리아 플라스미드, 예컨대 pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체를 포함하는 대장균(Escherichia coli)으로부터의 플라스미드, 더 넓은 숙주 범위의 플라스미드, 예컨대 M13 및 사상 단일-가닥 DNA 파지를 포함한다.

[0243] 하나 이상의 관심 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 적절한 프로모터의 제어 하에 있는 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고등 진핵 세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 *대장균(E. coli)* 또는 간균(bacilli)을 포함한다. 고등 진핵 세포는 이하에 기재된 바와 같이 포유류 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 무세포 번역 시스템 또한 사용될 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유류 세포 숙주와 함께 사용하기 위한 적절한 클로닝 및 발현 백터는 Pouwels *et al*. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)에 기재되어 있고, 관련 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 단백질 제조 방법에 관한 추가 정보는, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2008/0187954, 미국 특허 번호 6,413,746 및 6,660,501 및 국제 특허 공개 번호 WO 04009823에서 확인할 수 있으며, 이들은 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0244] 형질전환된 숙주에 의해 제조된 단백질은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 표준 방법은 크로마토그래피(*예를 들어*, 이온 교환, 친화도 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 구배, 원심분리, 차등 용해도 또는 단백질 정제를 위한 다른 임의의 표준 기술을 포함한다. 적절한 친화도 컬럼의 통과에 의해 정제가 가능하도록, 친화도 태그, 예컨대 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제는 단백질에 부착될 수 있다. 단리된 단백질은 또한 단백질 분해, 핵 자기 공명 및 x-선 결정학과 같은 그러한 기술을 사용하여 물리적으로 특징화될 수 있다.

[0245] 본 발명의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 통합 또는 비-통합 벡터를 보유하는 세포는 발현 벡터 내에 리포터 유전자(reporter gene)를 포함함으로써 *시험관내*에서 확인될 수 있다. 일반적으로, 선택가능한 리포터는 선택을 가능하게 하는 특성을 부여하는 것이다. 양성 선택가능한 리포터는 리포터 유전자의 존재가 이의 선택을 가능하게 하는 한편, 음성 선택가능한 리포터는 이의 존재가 이의 선택을 방지하는 것이다. 양성 선택가능한 마커의 예는, 약물 저항성 마커(네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 저항성을 부여하는 유전자)이다. 다른 종류의 리포터는 GFP와 같은 스크리닝가능한 리포터를 포함한다.

[0246] 증폭/발현 방법, 면역조직화학 방법, FISH 및 셰드 항원 검정, 서던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅 또는 PCR 기술과 같은, 단백질(*예를 들어*, 재조합 단백질)의 수준 및 활성을 결정하기 위한 다양한 검정이 이용가능하다. 더욱이, 단백질 발현 또는 증폭은, 생체내 진단 검정 사용, *예를 들어*, 검출될 단백질에 결합하고 검출가능한 표지(*예를 들어*, 방사성 동위원소)로 태깅된 분자(예컨대, 항체)를 투여하고, 표지의 위치에 대해 환자를 외부에서 스캔함으로써 평가될 수 있다. 따라서, 세포에서 단백질 수준의 수준을 측정하는 방법은 일반적으로 당업계에 알려져 있고, 이를 이용하여 경우에 따라 본원에 제공된 방법 및 조성물과 연계하여 단백질 수준 및/또는 활성을 평가할 수 있다. 이러한 검정을 이용하여, 이식유전자에 의해 인코딩된 재조합 단백질로의 변형의 효과를 결정할 수 있다. 예를 들어, 변형이 정상 수준 또는 완전한 기능의 유전자 생성물을 생성할 수 없는 이식유전자를 초래하는지 여부를 결정하거나, 재조합 단백질의 전부 또는 일부의 돌연변이를 포함하는 이식유전자를 확인하기 위해,

이러한 검정이 사용될 수 있다.

[0247] 제형화 시, 비경구 투여를 위한 수용액은 투여 제형과 호환가능한 방식으로, 치료적 또는 예방적으로 효과적인 그러한 양으로 투여될 것이다. 용액은 필요한 경우 적절하게 완충될 수 있고, 먼저 액체 희석제가 충분한 식염수 또는 포도당으로 등장성이 된다. 이러한 특정 수용액은 특히 혈관내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본원에 비추어 당업자에게 알려질 것이다.

[0248] 본원에 기재된 조성물의 세포, 미토콘드리아 또는 추가 활성제의 적절한 투여량은 치료될 질환, 병리학적 상태 또는 장애의 종류; 질환, 병리학적 상태 또는 장애의 중증도 및 경과; 이전 요법에 대한 질환, 병리학적 상태 또는 장애의 민감성; 대상체의 임상 이력 등에 따라 다르다. 조성물은 1회 또는 수일 내지 수개월 동안 지속되는 일련의 치료에 걸쳐 또는 치유가 이루어지거나 질환, 병리학적 상태 또는 장애의 상태의 감소가 달성될 때까지 투여될 수 있다.

[0249] 본 발명의 특정 양태에 따른 줄기세포는 TeSR 배지와 같은, 정의된 피더-비의존적(feeder-independent) 배양 시스템을 사용하여 본질적으로 미분화된 상태로 배양되고 유지될 수 있다(Ludwig *et al.*, Nat. Biotechnol. 2006, 24(2):185-7 및 Ludwig *et al.*, Nat. Methods 2006, 3(8):637-46). 피더-비의존적 배양 시스템 및 배지는 줄기세포를 배양하는 데 사용될 수 있다. 이러한 접근법은 마우스 섬유아세포 "피더 층(feeder layers)"을 필요로 하지 않고 줄기세포가 본질적으로 분화된 상태로 성장할 수 있게 한다.

[0250] 본 발명의 특정 양태에 따른 세포를 배양하기 위한 세포 배양 배지는, TeSR, BME, BGJb, CMRL 1066, 글라스고우(Glasgow) MEM, 임프로프드 MEM 징크 옵션(Improved MEM Zinc Option), IMDM, 미디엄(Medium) 199, 이글(Eagle) MEM, αMEM, DMEM, Ham, RPMI 1640 및 피셔 배지뿐만 아니라 이들의 임의의 조합 중 임의의 것과 같이, 기초 배지로서 동물 세포를 배양하기 위해 사용되는 배지를 사용하여 제조될 수 있지만, 배지는 동물 세포 배양을 위해 사용될 수 있는 한, 특별히 한정되지 않는다. 특히, 배지는 무이종(xeno-free)이거나 화학적으로 정의될 수 있다.

[0251] 세포 배양 배지는 혈청 함유 또는 혈청 미함유 배지일 수 있다. 혈청 미함유 배지는 미처리 또는 미정제된 혈청을 갖지 않는 배지를 지칭하고, 이에 따라 정제된 혈액 유래 구성요소 또는 동물 조직 유래 구성요소(예컨대, 성장 인자)를 갖는 배지를 포함할 수 있다. 이종 동물 유래 구성요소의 오염을 방지하는 측면에서, 혈청은 줄기세포(들)의 그것과 동일한 동물로부터 유래될 수 있다.

[0252] 세포 배양 배지는 혈청에 대한 임의의 대안을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 혈청에 대한 대안은, 알부민(예컨대, 지질-풍부 알부민, 재조합 알부민과 같은 알부민 대체물, 식물 전분, 덱스트란 및 단백질 가수분해물), 트랜스페린(또는 다른 철 수송체), 지방산, 인슐린, 콜라겐 전구체, 미량 원소, 2-머캅토에탄올, 3'-티올글리세롤, 인간 혈장 용해물 또는 이들 대한 등가물을 적절하게 함유하는 물질을 포함할 수 있다. 혈청에 대한 대안은, 예를 들어, 국제 공개 번호 98/30679에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있다. 대안적으로, 보다 편리함을 위해 상업적으로 입수가능한 임의의 물질이 사용될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 물질은 녹아웃 혈청 대체물(knockout Serum Replacement, KSR), 화학적으로 정의된 지질 농축물(깁코(Gibco)) 및 글루타맥스(Glutamax)(깁코)를 포함한다.

[0253] 세포 배양 배지는 또한 지방산 또는 지질, 포도당, 아미노산(예컨대, 비필수 아미노산), 비타민(들), 성장 인자, 사이토카인, 항산화 물질, 2-머캅토에탄올, 피루브산, 완충제 및 유기염을 함유할 수 있다. 2-머캅토에탄올의 농도는, 예를 들어, 약 0.05 내지 1.0 mM, 특히 약 0.1 내지 0.5 mM일 수 있으나, 농도는 줄기세포(들)을 배양하기에 적절하다면 특별히 한정되지 않는다.

[0254] 본 발명의 특정 양태에 따라 세포를 배양하기 위해 사용되는 배양 용기는, 플라스크, 조직 배양용 플라스크, 접시, 페트리 접시, 조직 배양용 접시, 멀티 접시, 마이크로 플레이트, 마이크로 웰 플레이트, 멀티 플레이트, 멀티 웰 플레이트, 마이크로 슬라이드, 챔버 슬라이드, 튜브, 트레이, 셀스택(CellSTACK)®, 챔버, 배양 가방 및 회전 병을 포함할 수 있지만, 그것에서 줄기세포를 배양할 수 있는 한 특별히 한정되지 않는다. 세포는, 배양의 필요에 따라, 적어도 또는 약 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 800 ml, 1000 ml, 1500 ml 또는 이들에서 파생가능한 임의의 범위의 부피로 배양될 수 있다. 특정 실시양태에서, 배양 용기는 바이오리액터일 수 있고, 이는 생물학적 활성 환경을 지원하는 임의의 디바이스 또는 시스템을 지칭할 수 있다. 바이오리액터는 적어도 또는 약 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500리터, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 입방 미터 또는 이들에서 파생가능한 임의의 범위의 부피를 가질 수 있다.

[0255] 배양 용기는 세포 접착성 또는 비-접착성일 수 있고, 목적에 따라 선택될 수 있다. 세포 접착성 배양 용기는 세포에 대한 용기 표면의 접착성을 향상시키기 위해 세포외 바탕질(ECM)과 같은 세포 접착을 위한 임의의 기질로 코팅될 수 있다. 세포 접착을 위한 기질은 세포를 부착하도록 의도된 임의의 물질일 수 있다. 세포 접착을 위한 기질은 콜라겐, 젤라틴, 폴리-L-라이신, 폴리-D-라이신, 라미닌 및 피브로넥틴, 이들의 단편 또는 혼합물을 포함한다.

[0256] 또한, 본 발명의 특정 양태에 따른 세포는, 겔/생체고분자 캡슐화(미국 공개 2007/0116680) 또는 담체 상의 현탁 배양(Fernandes *et al.*, Nature Cell Biology, 2004; 6:1082-93)을 포함하는, 현탁 배양에 의해 배양된다. 용어 세포의 현탁 배양은 세포가 배지의 피더 세포(사용되는 경우) 또는 배양 용기에 대해 비-부착 조건에서 배양되는 것을 의미한다.

[0257] 본원에 기재된 다양한 접근법을 본 발명과 함께 이용하여, 줄기세포를, 비제한적으로, 케라티노사이트, 조혈 세포, 근세포, 섬유아세포, 상피 세포 및 표피 세포를 포함하는 세포 또는 세포 계통 및 이로부터 유래된 조직 또는 장기로 분화시킬 수 있다.

[0258] 실시예

[0259] 본원에 개시된 실시예 및 실시양태는 단지 예시의 목적을 위한 것이고, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이며, 본 출원의 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0260] 실시예 1

[0261] 돼지 미토콘드리아를 이용한 세포의 처리는 급성 및 만성적인 저온 노출 후 산소 소모율을 향상시킨다

[0262] 돼지 미토콘드리아를 단리하기 위해, 좌심실 전체를 새로 절제된 돼지 심장으로부터 제거하고 수송을 위해 얼음처럼 차가운 세척 배지(300 mM 수크로스, 1 mM EGTA, 10mM HEPES(pH 7.4))에 넣었다. 조직의 1인치 정사각형 조각을 좌심실로부터 절단하고, 20 mL의 얼음처럼 차가운 트레할로스 완충액을 함유하는 사전-냉각된 50 ml의 코니칼 튜브로 옮겼다. 조직 샘플을 잘게 썰어 대략 1-2 mm 크기의 샘플 조각을 수득하였다. 샘플을 얼음 위에서 10분 동안, 서브틸리신 A 용액(250 μl의 트레할로스 완충액 중 5 mg/ml의 서브틸리신 A) 중에 효소적으로 소화산물화하고, 포터-엘베젬(Potter-Elvehjem) 패턴 조직 균질화기를 사용하여 균질화시켰다(3-7회 시도). 그 후, 샘플을 거즈를 통해 50 ml의 코니칼 튜브로 통과시켰다. 샘플을 원심분리하고(500 g으로 4℃에서 10분) 상청액을 새로운 50 mL의 코니칼 튜브로 옮겨 부었다. 샘플을 15,000 g으로 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버렸다. 샘플 펠렛을 500 μl의 트레할로스 완충액에 재현탁시키고, 1.5 ml의 에펜도르프 튜브로 옮겼다. 그 후, 50 ml의 코니칼 튜브를 500 μl의 트레할로스 완충액으로 헹구고, 이를 1.5 ml의 에펜도르프 튜브 내 샘플에 첨가하였다. 샘플 펠릿을 원심분리(15,000 g으로 4℃에서 10분)로 3회 세척하고, 1 mL의 트레할로스 완충액에 재현탁하였다.

[0263] 미토콘드리아 호흡의 지표인 산소 소모율(OCR)은 시홀스 엑스트라셀룰러 플럭스(Seahorse Extracellular Flux)(XF) 분석기(매사추세츠 노스 빌레리카 소재의 시홀스 바이오사이언스 주식회사(Seahorse Bioscience, Inc.))를 사용하는 시홀스 검정을 이용하여 살아 있는 세포에서 실시간으로 결정될 수 있음이 이전에 밝혀졌다. Rose, S., et al., PLOS One(2014), 9(1):e85436("Rose *et al.*")을 *참조*하고, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. Rose *et al.*은 미토콘드리아 호흡, 예컨대 기초 호흡, ATP 연결 호흡, 양성자 누출 호흡 및 예비 능력의 여러 측정값이 특정 억제제로 세포를 처리함으로써 유도될 수 있음을 보여주었다. *위와 동일*. 특히, 세포를 복합체 V의 억제제인 올리고마이신으로 처리하여, ATP 연결 호흡 및 양성자 누출 호흡을 유도할 수 있다. 프로토노포오인 카보닐 시아나이드-p-트리플루오로메톡시페닐-하이드라존(FCCP)은 미토콘드리아 내막 구배를 붕괴시키고, 전자 수송 사슬(ETC)로 하여금 최대 레이트로 기능하도록 한다. *위와 동일*. 따라서 세포를 FCCP로 처리하여 최대 호흡 능력을 결정할 수 있다. *위와 동일*. ETC 기능을 효과적으로 정지시키기 위해, 복합체 I 억제제인 로테논 및 복합체 III 억제제인 안티마이신 A의 조합으로 처리하여, 비-미토콘드리아 호흡을 결정할 수 있다.

[0264] 단리된 돼지 미토콘드리아를 이용한 인간 폐 동맥 내피 세포(HPAEC)의 처리가 급성 저온 노출 후 산소 소모율(OCR)에 미치는 영향을 시홀스 검정에 의해 결정하였다. HPAEC를 4℃에서 6시간 동안 두었다. HPAEC는 20 uL의 미토콘드리아 현탁액(세포당 29개의 입자를 함유하는 호흡 완충액, "+ MITO") 또는 20 μL의 호흡 완충액 단독("- MITO")의 존재 하에, 37℃에서 1시간 동안 산소정상상태에서 회복하였고, 비-CO_2 항온처리기에서 10분 동안 평형을 유지하였다. 그 후, 10 uM 올리고마이신, 20 uM FCCP 및 5 uM 로테논/안티마이신 A(Rot/AA)과 함께 시홀스 기구를 사용하여 "미토콘드리아 스트레스 테스트"를 수행하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리

아 처리는, 상응하는 기준선, 올리고마이신-처리, FCCP-처리 또는 Rot/AA-처리 "- MITO" HPAEC 대조군에 비해, 기준선에서의 OCR(43.6% 증가), 올리고마이신-처리 HPAEC(204.9% 증가), FCCP-처리 HPAEC(8.4% 증가) 및 Rot/AA-처리 HPAEC(34.1% 증가)를 증가시켰다.

[0265] 또한, HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 만성 저온 노출 후 OCR에 미치는 영향을 시험하였다. HPAEC를 4℃에서 12시간 동안 두었다. HPAEC는 20 uL의 미토콘드리아 현탁액(세포 당 172개 입자를 함유하는 호흡 완충액; "+MITO") 또는 20 μL의 호흡 완충액 단독("- MITO")의 존재 하에 37℃에서 1시간 동안 정상산소상태에서 회복하였고, 비-CO_2 항온처리기에서 50분 동안 평형을 유지하였다. HPAEC를 비-CO_2 조건에서 37℃로 시홀스 기구에 남겨두었다. 그 후, 10 uM 올리고마이신, 20 uM FCCP 및 5 uM 로테논/안티마이신 A(Rot/AA)와 함께 시홀스 기구로 "미토콘드리아 스트레스 테스트"를 수행하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리아 처리는, 상응하는 기준선, 올리고마이신-처리, FCCP-처리 또는 Rot/AA-처리 "- MITO" HPAEC 대조군에 비해, 기준선에서의 OCR(32.4% 증가), 올리고마이신-처리 HPAEC(51.9% 증가), FCCP-처리 HPAEC(9.5% 증가) 및 Rot/AA-처리 HPAEC(45.2% 증가)를 증가시켰다.

[0266] 저온 스트레스에 노출된 HPAEC에 의한 돼지 미토콘드리아의 흡수를 돼지 미토콘드리아(*멧돼지*) ND5(MtND5)에 특이적인 프로브를 사용하여 평가하였다. 특히, 저온 스트레스 중 그리고 저온 회복 중에 돼지 미토콘드리아 처리의 효과를 평가하였다. 돼지 미토콘드리아를 저온 스트레스를 받은 HPAEC에 투여하였다. 저온 회복 군의 경우, HPAEC를 돼지 미토콘드리아 처리 전 정상온도에서 24시간, 이어서 4℃에서 24시간 동안 배양하였다. 돼지 미토콘드리아 처리 후, 저온 회복 HPAEC를, 수확하기 전 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 회복 조건(37℃의 정상온도)에서 항온처리하였다. 저온 노출 군의 경우, 세포를 정상온도에서 48시간 동안 배양하고, 돼지 미토콘드리아로 처리하고, 즉시 4℃에 두었다. 저온 노출 HPAEC를 저온 노출 24시간, 48시간 또는 72시간 후에 수확하였다. 각 샘플에 대해 cDNA를 생성하고, 프라이머/프로브 혼합물을 사용하여 돼지 MtNND5(정방향 프라이머 서열 CAGCACTATGTGCAATCACACAAAA; 역방향 프라이머 서열 TGGTTGATGCCGATTGTCACTATT; 리포터 서열 TCGTAGCCTTCTCAACTTC; 콘텍스트 서열 CAGCACTATGTGCAATCACACAAAA)의 발현 수준을 기준 유전자 PPIA와 비교하여 조사하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, 저온 스트레스 하의 HPAEC는 투여량-의존 방식으로 돼지 미토콘드리아를 흡수하고, 돼지 MtND5의 최대 발현은 세포당 1,666개 입자에서 달성되었다. 저온 회복 조건에서, 돼지 MtND5의 최대 발현은 24시간에 달성되었으며, 여기서 미처리된 저온 회복 대조군에 비해 돼지 MtND5의 26,201% 증가를 관찰하였다. 저온 노출 조건에서, 돼지 MtND5의 최대 발현은 72시간에 달성되었으며, 여기서 미처리된 저온 노출 대조군에 비해 MtND5의 301,932% 증가를 관찰하였다.

[0267] 도 4에 도시된 바와 같이, 저온 스트레스에 노출된 HPAEC에서 인간 미토콘드리아 DNA의 전사는 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 크게 영향 받지 않았다. HPAEC를 저온 회복 또는 저온 노출 조건에서 처리하고, 배양하고, 상기한 바와 같이, 24-시간, 48-시간 또는 72-시간의 시점에 수확하였다. 인간 MtND5에 특이적인 프로브를 사용하여 결정된 바와 같이, 저온 회복 조건 하에 미처리된 대조군 HPAEC는 정상온도의 대조군에 비해 인간 MtND5 발현의 55% 증가를 나타내었다. 이러한 증가는 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 완화되었으며, 여기서 1개 입자/세포가 미처리된 정상온도의 HPAEC에 비해 3.8%의 발현 감소 및 미처리된 저온 회복 대조군에 비해 33%의 발현 감소를 나타내었다. 저온 노출 군에서, 인간 MtND5의 최대 발현은 72시간에 달성되었지만, 이러한 증가는 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 유의미하게 영향을 받지 않았다.

[0268] 종합하면, 이러한 발견은 저온 스트레스에 노출된 인간 내피 세포가 돼지 미토콘드리아를 흡수하여 저온 손상 후 세포의 산소 소모율을 증가시키고 인간 미토콘드리아 RNA의 전사에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 올리고마이신 처리된 "-MITO" HPAEC 대조군에 비해, 돼지 미토콘드리아 처리는 급성 및 만성 저온 노출 후 올리고마이신 처리된 HPAEC에서 OCR을 증가시켰다(도 1 및 2). 이러한 데이터는 미토콘드리아 처리가 양성자 누출 호흡을 증가시킨다는 것을 나타낸다(즉, 양성자가 ATP를 생성하지 않고 바탕질로 이동하는 과정). 연구가 시사하는 바는 양성자 누출 호흡이 미토콘드리아 활성산소종(ROS) 생성을 감소시키고, 다양한 질환에서의 ROS로부터 이러한 누출 또는 분리(uncoupling)를 보호한다는 것이다. *예를 들어,* Ganote, C.E. and S.C. Armstrong, J Mol Cell Cardiol. 2003, 35(7):749-59; Speakman, J.R., *et al.*, Aging Cell. 2004, 3(3):87-95; 및 Green, K., *et al.*, Diabetes. 2004, 53(Suppl. 1):S110-8를 *참조*하라. 따라서 돼지 미토콘드리아 처리는 당뇨병 및 심혈관 질환과 같은 다양한 질환에서의 ROS로부터 보호할 수 있다.

[0269] 실시예 2

[0270] 저온 회복 및 저온 노출 중 돼지 미토콘드리아 처리는 염증, 선천적 면역 반응 및 세포 스트레스와 관련된 유전자의 발현을 변경한다

[0271] NF-κB는 전-염증성 유전자 발현을 상향조절하는 것으로 알려진 전사 인자이다. 돼지 미토콘드리아 처리가 저온 노출 및 저온 회복 조건 하의 HPAEC에서 NF-κB 유전자 발현에 미치는 효과를 qRT-PCR에 의해 평가하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 24시간에 저온 회복에서 NF-κB 발현을 감소시킨다. HPAEC를 저온 회복 또는 저온 노출 조건에서 처리하고, 배양하고, 도 3에 대해 상기한 바와 같이, 24-시간, 48-시간 또는 72-시간의 시점에 수확하였다. 저온 회복 조건에서, 미처리된 대조군 HPAEC는 정상온도의 대조군에 비해 24시간에서 NF-κB 발현의 83% 증가를 나타내었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 NF-κB 발현을 감소시키는 경향이 있었고, 1개 입자/세포가 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 22% 감소를 나타내었다. 저온 노출 조건에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 24시간에 NF-κB 발현의 약간의 증가가 일어났지만, 이러한 증가는 통계적으로 유의미하지 않다. 이러한 데이터는 인간 내피 세포의 돼지 미토콘드리아 처리가 저온 노출로부터 회복과 관련된 전-염증성 반응을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0272] 톨-유사 수용체-9(TLR-9)는 사이토솔 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 인식할 때 선전적 면역 반응을 활성화하며, 이는 세포 손상의 징후이다. 도 6에 도시된 바와 같이, HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 24시간 후 저온 회복에서 TLR-9 발현을 감소시켰다. HPAEC를 저온 회복 또는 저온 노출 조건에서 처리하고, 배양하고, 도 3에 대해 상기한 바와 같이, 24-시간, 48-시간 또는 72-시간의 시점에 수확하였다. 저온 회복 조건에서, 미처리된 대조군 HPAEC는 정상온도의 대조군에 비해 24시간에서 TLR-9 발현의 101% 증가를 나타내었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 TLR-9 발현을 감소시키는 경향이 있었고, 166개 입자/세포가 미처리된 저온 회복 대조군 HPAEC에 비해 37% 감소를 나타내었다. 저온 노출 조건에서, TLR-9의 최대 발현은 1개 입자/세포로 처리된 HPAEC에서 일어났으며, 여기서 미처리된 저온 노출 대조군 HPAEC에 비해 TLR-9 발현의 60% 증가를 관찰하였다. 이러한 데이터는 저온 회복 중, 인간 내피 세포의 돼지미토콘드리아 처리가 저온 노출로부터의 세포 손상과 관련된 선천적 면역 반응을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0273] 헴 옥시게나제-1(HO-1)의 상향조절은, 염증 및 조직 손상을 감소시키고, 세포 스트레스 동안, 동결보호적이다. 도 7에 도시된 바와 같이, HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 HO-1의 발현에 영향을 미친다. HPAEC를 저온 회복 또는 저온 노출 조건에서 처리하고, 배양하고, 도 3에 대해 상기한 바와 같이, 24-시간, 48-시간 또는 72-시간의 시점에 수확하였다. 돼지 미토콘드리아 처리는 저온 노출 조건에서 HO-1 발현을 증가시켰다. 돼지 미토콘드리아 처리는 16개 입자/세포에서 최대로 효과적이었고, 여기서 미처리된 저온 노출 대조군 HPAEC에 비해 HO-1 발현의 24% 증가를 확인하였다(미처리된 정상온도의 대조군 HPAEC에 비해 242% 증가). 이러한 데이터는 인간 내피 세포의 돼지미토콘드리아 처리가 HO-1 발현을 증가시킴으로써 저온 노출 중에 염증 및 세포 손상을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0274] 실시예 3

[0275] 저산소 조건에서 돼지 미토콘드리아를 이용한 세포의 처리는 전-염증성 유전자 산물의 분비를 감소시킨다

[0276] HPAEC를 돼지 미토콘드리아 처리 전 24시간 동안 산소정상상태 또는 저산소(1% O_2)에서 배양하여, 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 인간 내피 세포에 미치는 효과를 평가하였다. 돼지 미토콘드리아 처리 후, HPAEC를, 이들의 각각의 조건인 산소정상상태 또는 저산소로 되돌려 놓았다. 그 후, 300 μL 세포 배양 배지를 24시간, 48시간 또는 72시간에 수집하고, 적절한 시점(24시간, 48시간 또는 72시간)에 멸균 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 넣었다. 튜브를 4℃에서 2,000 rpm으로 10분 동안 하향 회전시켰다. 상청액(270 μL)을 수집하고, 신선한 멸균 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 넣었다. 이러한 샘플을 염증성 사이토카인 어레이로 분석할 때까지 -80℃에 즉시 보관하였다. 분비된 전-염증성 유전자 산물을 염증성 사이토카인 어레이(조지아주 노르코스 소재의 레이바이오테크(RayBiotech))를 사용하여 세포 배양 배지에서 측정하였다. 백그라운드 보정을 위해 배지-전용 대조군을 활용하였다.

[0277] 집락 자극 인자-1(CSF-1)로도 알려진 대식세포-집락 자극 인자(M-CSF)는 치유를 촉진하지만 M1 표현형을 갖는 대식세포도 촉진한다. 허혈/이식 모델에서, M-CSF 혈청 수준은 이식된 장기의 급성 거부반응 동안에 급증한다. 도 8에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 M-CSF 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 최대로 효과적이었으며, 여기서 M-CSF 분비는 48시간에서 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 65% 감소되었다.

[0278] 케모카인(C-C 모티프) 리간드 4(CCL4)로도 알려진 대식세포 염증성 단백질-1β(MIP-1β)는 감염 및 염증에 대한 면역 반응에 중요하다. MIP-1β는 면역 세포를 활성화시켜, 급성 염증을 유발하고, IL-1β, IL-6 및 TNF-α와 같은 전-염증성 사이토카인의 합성 및 방출을 유도할 수 있다. 도 9에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인

어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 MIP-1β 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 MIP-1β 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 MIP-1β 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 73% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소를 관찰하였다.

[0279] 혈소판 유래 성장 인자-BB(PDGF-BB)는 전-염증성 사이토카인 생성의 강력한 유도제이고 세포의 증식을 자극한다. 도 10에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 PDGF-BB 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 36개 입자/세포에서 PDGF-BB 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 PDGF-BB 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 69% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소를 확인하였다.

[0280] 케모카인(C-C 모티프) 리간드 5(CCL5)로도 알려진 란테스는 NF-κB 경로에 의해 상향조절되는 전-염증성 케모카인이다. 란테스는 백혈구를 염증 사이트로 동원하는 데 활약한다. 도 11에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 란테스 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 0.3개 입자/세포에서 란테스 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 란테스 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 59% 감소하였다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소를 확인하였다.

[0281] 염증 상태에서, 세포내 부착 분자-1(ICAM-1)은 면역 세포가 손상 사이트로 통과할 수 있도록 상향조절된다. ICAM-1 발현은 전-염증성 환경을 유지하여 면역 세포의 이동을 가능하게 한다. 도 12에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 ICAM-1분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 0.3 입자/세포에서 ICAM-1 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 ICAM-1 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 82% 감소되었다. 3,687개 입자/세포에서 효험 감소를 확인하였다.

[0282] 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF)는 저산소 노출 후 HPAEC에 의해 분비되는 것으로 알려져 있으며, PAH 발병기전에 역할을 할 수 있다. 도 13에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 BDNF 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 BDNF 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 BDNF 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 85% 감소되었다.

[0283] 인터루킨-1β(IL-1β)는 염증에 연루된 전-염증성 사이토카인이다. IL-1β의 발현은 인플라마솜에 의해 조절된다. 도 14에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 IL-1β 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 368개 입자/세포에서 IL-1β 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 IL-1β 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 70% 감소되었다.

[0284] 성장/분화 인자 15(GDF15)는 TGF-β 슈퍼패밀리의 구성원이다. 폐에서, GDF15의 과발현은 지나친 면역 반응을 유발하는 반면, GDF15 발현의 억제는 염증 반응을 약화시킨다. 도 15에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 GDF15 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 GDF15 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 GDF15 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 70% 감소되었다.

[0285] 인터루킨-6(IL-6)은 조직 손상에 반응하여 생성되는 다면발현성 사이토카인이다. IL-6은 염증과 면역 세포 활성화에 역할을 한다. 도 16에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 IL-6 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 368개 입자/세포에서 IL-6 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 IL-6 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 70% 감소되었다.

[0286] 형질전환 성장 인자-β1(TGF-β1)은 강력한 조절 및 염증 활성을 갖는 다면발현성 사이토카인이다. IL-6의 존재에서, TGF-β1은 염증 환경을 촉진하는 T-헬퍼 17(Th17) 세포의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 도 17에 도시된 바와 같이, 전-염증성 사이토카인 어레이에 의한 검정은 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 조건에서 형질전환 성장 인자-β1(TGF-β1) 분비를 감소시켰음을 보여주었다. 돼지 미토콘드리아 처리는 36개 입자/세포에서 TGF-β1 분비를 감소시키는 데 최대로 효과적이었고, 여기서 TGF-β1 분비는 48시간에 미처리된 저산소 대조군 HPAEC에 비해 95% 감소되었다.

[0287] 저산소 스트레스에 노출된 HPAEC에 의한 돼지 미토콘드리아의 흡수를 돼지 MtND5에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 평가하였다. 특히, 저산소 노출 중 그리고 저산소 회복 중 돼지 미토콘드리아 처리의 효과를 평가하였다. 돼지 미토콘드리아를 저온 스트레스를 받은 HPAEC에 투여하였다. 저산소 회복 군의 경우, HPAEC를 돼지 미토콘드리아 처리 전, 산소정상상태에서 24시간, 이어서 저산소(1% O_2)에서 24시간 동안 배양하였다. 돼지 미토콘드리아 처리 후, 저산소 회복 HPAEC를 수확하기 전 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 산소정상상태로 되돌려 놓았다. 저산소 노출 군의 경우, HPAEC를 산소정상상태에서 48시간 동안 배양하고, 돼지 미토콘드리아로 처리하고, 즉시 저산소(1% O_2)에 두었다. 저산소 노출 HPAEC를 저산소 노출 24시간, 28시간 또는 72시간 후에 수확하였다. 돼지 MtND5에 특이적인 프로브를 사용하여 결정되고 도 18에 도시된 바와 같이, 저산소 스트레스 하에서 HPAEC는 투여량-의존 방식으로 돼지 미토콘드리아를 흡수하고, 돼지 MtND5의 최대 발현은 세포당 1,666개 입자에서 달성되었다. 저산소 회복 조건에서, 돼지 MtND5의 최대 발현은 48시간에 달성되었고, 여기서 미처리된 저산소 회복 대조군에 비해 돼지 mtND5의 4,655% 증가를 관찰하였다. 저산소 노출 조건에서, 최대 발현은 24시간에 달성되었으며, 여기서 미처리된 저산소 노출 대조군에 비해 돼지 mtND5의 26,680% 증가를 관찰하였다.

[0288] 도 19에 도시된 바와 같이, 저산소 스트레스에 노출된 HPAEC에서 인간 미토콘드리아 DNA의 전사가 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 크게 영향 받지 않았다. HPAEC를 저산소 회복 또는 저산소 노출 조건에서 처리하고, 배양하고, 도 18에 대해 상기한 바와 같이, 24-시간, 48-시간 또는 72-시간의 시점에 수확하였다. 인간 MtND5에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 결정된 바와 같이, 저산소 회복 군 및 저산소 노출 군 모두에 대한 인간 MtND5의 최대 발현은 72시간에 일어났다. 돼지 미토콘드리아 처리에 의해 영향을 받은 것으로 보이는 시점은 24시간에 일어났다. 저산소 회복 군에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 인간 MtND5 발현이 감소하는 경향이 있었으며, 1개 입자/세포가 24시간에서 미처리된 저산소 대조군에 비해 33% 감소된 발현을 나타내었다. 저산소 노출 군에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 인간 MtND5 발현이 증가하는 경향이 있었으며, 1,666개 입자/세포가 24시간에서 미처리된 저산소 노출 세포에 비해 36% 증가를 초래하였다.

[0289] 종합하면, 이러한 결과는 저산소 조건에 노출된 인간 내피 세포의 처리가 돼지 미토콘드리아를 흡수하여, 광범위한 전-염증성 유전자 산물의 분비를 감소시키고 인간 미토콘드리아 RNA의 전사에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 돼지 미토콘드리아 처리가 장기 또는 조직 이식 뿐만 아니라 세포, 조직 및 장기의 저온 보관 또는 수송 중 저산소와 관련된 염증 및 세포 손상을 감소시키는 효과적인 수단임을 시사한다.

[0290] 실시예 4

[0291] 돼지 미토콘드리아를 이용한 세포의 처리는 저산소 조건에서 유전자 발현을 변경한다

[0292] 돼지 미토콘드리아를 저산소 스트레스를 겪는 HPAEC에 투여하여, 저산소 조건에서 돼지 처리가 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 저산소 회복 군의 경우, 돼지 미토콘드리아 처리 전, HPAEC를 산소정상상태에서 24시간, 이어서 저산소(1% O_2)에서 24시간 동안 배양하였다. 돼지 미토콘드리아 처리 후, 저산소 회복 HPAEC를, 수확하기 전 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 산소정상상태로 되돌려 놓았다. 저산소 노출 군의 경우, 48시간 동안 산소정상상태에서 배양하고 돼지 미토콘드리아로 처리하고, 즉시 저산소(1% O_2)에 두었다. 저산소 노출 HPAEC를 저산소 노출 24, 28 또는 72시간 후 수확하였다. 유전자 발현을 qRT-PCR에 의해 평가하였다.

[0293] 상기에서 논의된 바와 같이, 톨-유사 수용체-9(TLR-9)는 사이토솔 mtDNA를 인식할 때 선천적 면역 반응을 활성화하며, 이는 세포 손상의 징후이다. HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 도 20에 도시된 바와 같이, 저산소 회복에서 TLR-9 발현을 감소시켰지만, 24시간에 저산소 노출에서 TLR-9 발현을 증가시켰다. 저산소 회복 군에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 TLR-9 발현이 감소하는 경향이 있었으며, 1개 입자/세포가 처리 후 24시간에서 미처리된 저산소 대조군에 비해 38% 감소된 발현을 나타내었다. 저산소 노출 군에서, 돼지 미토콘드리아로 처리된 HPAEC에서 TLR9 발현이 증가하는 경향이 있었으며, 1,666개 입자/세포가 처리 후 24시간에서 미처리된 저산소 노출 세포에 비해 32% 증가를 초래하였다. 이러한 데이터는 인간 내피 세포의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 회복 중 세포 손상과 관련된 선천적 면역 반응을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0294] 인터루킨-8(IL-8; CXCL8)은 염증 영역에서 호중구를 유인하고 활성화한다. IL-8의 상승은 이식 실패 및 다른 병리학적 결과에 대한 지표이다. 상기에서 논의된 바와 같이, IL-6은 조직 손상에 반응하여 생성되고 염증 및 면역세포 활성화에 역할을 하는 다면발현성 사이토카인이다. 도 21에 도시된 바와 같이, 저산소 스트레스를 겪는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 IL-8 및 IL-6의 mRNA 발현을 감소시켰다. 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 3,687개 입자/세포에서 IL-8 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이었으며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 IL-8 발현의 58% 감소를 확인하였다(도 21a). 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/

세포에서 IL-6 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 IL-6 발현의 30% 감소를 확인하였다(도 21b). 이러한 데이터는 인간 내피 세포의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 스트레스 및 조직 손상을 겪는 세포와 관련된 염증성 사이토카인 반응을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0295] BH3 상호작용-도메인 사멸 아고니스트(BID)는 세포자살 신호전달에 반응하여 미토콘드리아 외막을 파괴하는 역할을 하는 전-세포자살 단백질이다. 도 21에 도시된 바와 같이, 저산소 스트레스를 겪는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 BID의 mRNA 발현을 감소시켰다. 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 36개 입자/세포에서 BID 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 BID 발현의 30% 감소를 확인하였다(도 21c). 이러한 데이터는 인간 내피 세포의 돼지 미토콘드리아 처리가 저산소 스트레스에 의해 유도된 세포자살과 관련된 미토콘드리아 막 파괴를 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0296] 미토콘드리아 ND1(MtND1)은 미토콘드리아 산화적 인산화의 전자 수송 사슬의 제1 단계인, 호흡 복합체 1에 관여하는 유전자이다. 미토콘드리아 사이토크롬 B(MtCyB)는 호흡 복합체 III의 유일한 미토콘드리아 인코딩된 서브유닛이다. 도 21에 도시된 바와 같이, 저산소 스트레스를 겪는 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 MtND1 및 MtCyB의 mRNA 발현을 감소시켰다. 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 3개 입자/세포에서 인간 MtND1 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 MtND1 발현의 57% 감소를 확인하였다(도 21d). 저산소 HPAEC의 돼지 미토콘드리아 처리는 0.3 입자/세포에서 인간 MtCyB 발현을 감소시키는 데 최대로 효과적이며, 여기서 미처리된 저산소 대조군에 비해 MtCyB 발현의 57% 감소를 확인하였다(도 21e).

[0297] 24시간 저산소 노출은 숙주 세포 미토콘드리아 활성을 감소시키고, 따라서 미토콘드리아 유전자 발현(*예를 들어*, ND1 및 CyB 발현 증가)을 증가시키는 보상성 스트레스 반응을 생성한다. 돼지 미토콘드리아 이식은 저산소 스트레스로부터 숙주 세포를 보호하여, 유전적 보상에 대한 필요성을 제거한다. 또한, 돼지 미토콘드리아를 이용한 인간 내피 세포의 처리는 미토콘드리아 처리된 HPAEC의 총 세포 단백질 함량의 감소에 의해 나타난 바와 같이 저산소-유도 세포 증식을 감소시키는 것으로 밝혀졌다(도 22). 비정상적인 내피 세포 증식은 폐동맥고혈압을 포함하여, 폐 고혈압성 질환의 발병기전에 연루된다. *예를 들어*, Sakao, S. *et al.*, Respir Res. 2009; 10(1):95를 *참조*하라. 따라서 이러한 데이터는 돼지 미토콘드리아를 이용한 환자 세포의 *생체내* 또는 *생체외* 처리가 폐 질환을 치료하거나 폐 질환과 관련된 증상을 경감할 수 있음을 시사한다.

[0298] 실시예 5

[0299] 돼지 미토콘드리아를 이용한 상피 세포의 처리는 핵산 함량을 향상시킨다

[0300] 인간 폐포 상피 II형(AT2) 세포는 저온 보관소에서 나오면 낮은 생존력을 갖고, 세포 배양 플레이트에 잘 부착되지 않는다. 돼지 미토콘드리아 처리가 동결보존 후, 인간 폐 상피 세포의 세포 생존력 및 접착을 향상시키는지 여부를 결정하기 위해, AT2 세포를, 돼지 미토콘드리아가 있거나 없이, 저온 보관소로부터 직접 시딩하고, 표준 항온처리기에서 밤새 항온처리하였다. 밤새 항온처리한 후, 돼지 미토콘드리아로 처리된 AT2 세포의 핵산 함량은 미처리된 AT2 세포 대조군에 비해 23% 증가하였다(도 23). 이러한 데이터는 돼지 미토콘드리아 처리가 동결보존 후, 인간 폐 상피 세포의 세포 생존력, 접착 또는 성장을 향상시킨다는 것을 보여준다. 따라서 돼지 미토콘드리아 처리는 세포 요법의 일부로 시행되어, 폐 또는 폐 세포의 보관, 생존력 또는 기능을 향상시킬 수 있다.

[0301] 실시예 6

[0302] 돼지 미토콘드리아의 안정성 및 기능이 저온 보관 후 유지된다

[0303] 2개의 돼지 미토콘드리아 단리물("실험 1" 및 "실험 2")을 사용하여 시홀스 기구에서 미토콘드리아 활성을 테스트하였다. 일련의 미토콘드리아 희석액을 ADP-함유 호흡 완충액에서 생성하였다. 50 μL의 미토콘드리아 현탁액을 각각 8-웰 시홀스 세포 배양 플레이트의 6개 웰에 로딩하였다. 플레이트를 4℃에서 20분 동안 2000 xg으로 원심분리하였다. 원심분리 후, 200 μL의 ADP-함유 호흡 완충액(RB)을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 비-CO_2 항온처리기에서 10분 동안 평형화시켰다. 기준선 산소 소모를 시홀스 기구를 이용해 기록하였다. 도 24는 아데노신 디포스페이트(ADP)를 함유하는 호흡 완충액에서 다양한 농도로 단리된 돼지 미토콘드리아의 미토콘드리아 활성을 보여준다. ~$7e^9$개 입자(제타뷰(Zetaview)를 사용하여 입자를 계수함)에서 OCR의 "최대치 도달"을 관찰하였다.

[0304] 돼지 미토콘드리아가 저온 보관 후, 미토콘드리아 활성을 유지하는지 여부를 결정하기 위해, 돼지 미토콘드리아의 200 μL 분취량 3개를 15,000 xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고 2개의 펠릿을 200 μL의

ADP-함유 호흡 완충액(RB)에 재현탁하였다. 하나의 펠릿을 200 μL의 트레할로스(TH) 보관 완충액에 재현탁하였다. 하나의 RB 펠릿을 4℃에서 밤새 보관하고, 나머지 RB 및 TH 펠릿을 -80℃에서 보관하였다. 대략 22시간의 저온 보관 후, 튜브를 얼음 위에서 해동하고, 호흡 완충액을 사용하여 1:10 희석을 수행하였다. 전날에 취해진 새로 해동된 미토콘드리아(즉, 도 24의 "실험 2"의 돼지 미토콘드리아)의 대조군에 대해서도 1:10 희석을 이용하였다. 50 μL의 미토콘드리아 현탁액을 8-웰 시홀스 세포 배양 플레이트의 6개 웰에 로딩하였다. 플레이트를 4℃에서 20분 동안 2000 xg으로 원심분리하였다. 원심분리 후, 200 μL의 호흡 완충액을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 비-CO_2 항온처리기에서 10분 동안 평형화시켰다. 기준선 산소 소모를 시홀스 기구로 기록하였다. 도 25에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리아는 -80℃에서 저온 보관 후, 미토콘드리아 활성을 유지한다. 미토콘드리아 활성은 시간이 지남에 따라 4℃에서 감소하였지만, -80℃에서 보관은 대략 40%의 OCR(미토콘드리아 활성)의 유지를 초래하였다. 트레할로스에서 보관은 OCR을 향상시켜, 원래 OCR 비율에서 약 60%의 유지를 초래하였다.

[0305] 실시예 7

[0306] 돼지 미토콘드리아 처리는 EVLP 중 폐 기능을 향상시킨다

[0307] 돼지 폐를 팽창시키고 기관을 클램핑하여, *생체외* 폐 관류(EVLP)를 위한 폐를 준비하였다. 절차의 시작 전에 대략 1시간 동안 얼음처럼 차가운 식염수에 폐를 보관하였다. 실온에서 폐 동맥(PA) 및 주기관지(기관)에 캐뉼러를 삽입하였다. 좌심방(LA)을 개방한 채로 두어, 폐로부터 관류액의 자유로운 유출을 가능하게 하였다. 4-시간 EVLP 동안, 폐를 환기시키고, 중탄산염으로 완충되었고 5% CO_2, 95% N_2로 탈산소화된 37℃의 스틴 용액으로 관류하였다. 17 cmH_2O로 캡핑된 기도 압력으로 압력 제어된 환기를 이용하였다. PA 관류를 100 ml/분으로 시작하였고, 대략 30-45분에 걸쳐 300 ml/분으로 증가시켰다. EVLP를 하는 동안 관류를 300 ml/분으로 유지하였다. 미토콘드리아 주입 전에, 100%의 FiO_2에서 PA 및 LA PO_2를 측정하여 가스 교환을 평가하였다. 동적 유순도와 같은 생리학적 매개변수도 이 시점에 기록하였다. 그 후, 미토콘드리아 또는 호흡 완충액(대조군)을 PA 라인에 주입하고, 10분 동안 관류를 중단하여, 미토콘드리아가 폐로 흡수될 수 있게 하였다. 관류를 재개하였고, 주입 후 15분, 1시간, 2시간 및 4시간에 가스 교환을 포함하여, EVLP 평가를 수행하였다.

[0308] 도 26에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리아 처리는 EVLP를 하는 동안에 단리된 돼지 사체의 폐의 기능을 향상시켰다. 우측 폐 대조군에 비해, 좌측 폐에 주입된 단리된 돼지 미토콘드리아는 조직학에 의해 측정된 바와 같이(도 26a), 하부 폐(도 26a), 상부 폐(도 26b) 및 중간 폐(도 26c)에서 증식 세포 핵 항원(PCNA) 양성 세포를 증가시켰다. 돼지 미토콘드리아 처리는 하부 폐에서 24시간에 최대로 효과적이었고(도 26a), 여기서 대조군(화살표)에 비해 돼지 미토콘드리아 처리 세포에서 50%의 향상을 확인하였다. 도 31에 추가로 도시된 바와 같이, EVLP("+MITO") 중인 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아의 주입("+MITO")이 호흡 완충액이 주입된 돼지 사체의 폐("대조군")에 비해, 세포자살 세포의 백분율을 감소시키고(% 튜넬; 도 31a), 세포 부착 분자 CD31의 발현을 증가시킨다(도 31b). EVLP를 하는 동안, 돼지 사체의 폐로부터 취해진 조직 생검에 대한 튜넬 검정에 의해 세포자살 세포의 백분율을 결정하였다. 항-CD31 항체를 갖는 조직 생검의 면역형광 염색에 의해 CD31 발현을 결정하였다.

[0309] 도 27에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리아 처리는 EVLP를 하는 동안, 단리된 돼지 사체의 폐의 일회 호흡량(도 27a) 및 동적 압박(도 27b)의 매개변수를 향상시켰다. 단리된 돼지 미토콘드리아를 EVLP 중인 단리된 사체의 폐에 주입하고, 폐가 팽창을 계속하는 동안 관류를 10분 동안 중단하였다. 일회 호흡량(ml/kg) 및 동적 압박(TV/(PIP-PEEP))을, 주입 후 10분, 주입 후 1시간 및 주입 후 4시간에 결정하였다(TV = 일회 호흡량; PIP = 최대 흡기압; PEEP = 호기종말양압호흡). 기준선 일회 호흡량과 동적 압박은 각각 주입 전 일회 호흡량과 동적 압박을 나타낸다. 기준선에 비해, 주입 후 10분에서 일회 호흡량의 30% 향상 및 동적 압박의 40% 증가가 확인된다. 도 29에 추가로 도시된 바와 같이, 호흡 완충액이 주입된 EVLP 중인 돼지 사체의 폐에 비해, EVLP 중인 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아의 주입("+Mito")은 일회 호흡량(mL/kg; 도 29a) 및 가스 교환($\Delta PO_2/FiO_2$; 도 29b)을 증가시켰다.

[0310] 도 28은 EVLP 중인 단리된 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아를 주입한 후, 배지 포도당의 즉각적이고 점진적인 강하 뿐만 아니라 주입 후 1시간에 순환 암모늄의 17% 감소가 있었음을 보여준다. EVLP 중인 단리된 돼지 사체의 폐에 EVLP 개시 24분 후, 단리된 돼지 미토콘드리아를 주입하고, 대략 20시간 동안 EVLP를 유지하였다. 순환 배지의 포도당(g/L)을 바이오팻(뉴욕 보헤미아 소재의 사토리우스(Sartorius))(도 28a) 및 노바(매사추세츠 월섬 소재의 노바 바이오메디컬(Nova Biomedical))(도 28b)를 사용하여 정량화하고, 순환 암모늄

(NH_4^+; mmol/L)을 노바(도 28c)를 사용하여 정량화하였다. 초기 노바 포도당 및 암모늄 수준은 EVLP 후 0시간에서의 노바 포도당 및 암모늄 수준을 나타낸다. 기준선 노바 포도당 및 암모늄 수준은 돼지 미토콘드리아 주입 직전의 노바 포도당 및 암모늄 수준을 나타낸다. 도 30에 추가로 도시된 바와 같이, EVLP 중 돼지 사체의 폐로 단리된 돼지 미토콘드리아의 주입("+MITO")이 EVLP 중 호흡 완충액이 주입된 돼지 사체의 폐에 비해, 순환 락테이트의 양(mg/ml; 도 30a)을 감소시키고, 이는 포도당/락테이트 비율(도 30b) 증가로 이어진다.

[0311] 미토콘드리아 주입은 호흡 완충액 대조군에 비해 EVLP를 하는 동안 일회 호흡량 및 가스 교환을 증가시켰다(도 29). 미토콘드리아 주입은 EVLP를 하는 동안 순환 락테이트를 감소시켰고, 이는 포도당/락테이트 비율 증가로 이어졌다(도 30). 마지막으로, EVLP를 하는 동안 취해진 조직 생검은 EVLP를 하는 동안 튜넬 염색(세포자살 세포)의 감소 및 CD31(세포 부착 마커)의 증가를 나타냈다(도 31).

[0312] 종합하면, EVLP를 하는 동안 단리된 돼지 미토콘드리아로 처리된 폐는 향상된 세포 기능(*예를 들어*, 증가된 세포 생존력, 부착 및 성장), 향상된 폐 기능(*예를 들어*, 향상된 일회 호흡량, 동적 압박 및 가스 교환) 및 향상된 대사 활성(*예를 들어*, 증가된 포도당/락테이트 비율)을 보여주었다. 따라서, EVLP를 하는 동안 돼지 미토콘드리아 처리를 실행하여 폐 생존력 및 기능을 향상시킬 수 있다.

[0313] 실시예 8

[0314] 단리된 돼지 미토콘드리아의 건강 및 기능의 신속한 평가

[0315] 손상된 미토콘드리아의 표현형 특성(*예를 들어*, 스웰링, 불량조절된 mPTP 개방, 감소된 호흡, 감소된 막 전위 및 완전한 투과성)을 이용하여 단리된 돼지 미토콘드리아의 건강을 신속하게 평가하였다. 특히, 미토콘드리아를 물리적으로 손상시킨 단리물(즉, 과도한 열 생성, 효소에 장기간 노출) 또는 섬유증 심장으로부터 단리된 미토콘드리아에 대해, 건강한 미토콘드리아를 산출한 단리물의 표현형 특성을 비교하였다. 각각의 경우에서, 분석 전에 미토콘드리아를 -80℃에서 24시간 동안 보관하였다.

[0316] 도 32에 도시된 바와 같이, 미토콘드리아 스웰링, mPTP 개방 및/또는 미토콘드리아 호흡을 측정함으로써 단리된 미토콘드리아의 건강 및 기능을 신속하게 평가할 수 있다. 유세포 분석을 이용하여 미토콘드리아 스웰링을 측정하였다. 본 연구에 사용된 미토콘드리아를 -80℃에서 24시간 동안 보관하였다. 미염색된 미토콘드리아를 최대 30,000가지 사례 수집하였다. 평가된 매개변수는 전방 측면 산란 면적(forward side scatter area, FSC-A; 크기) 및 측면 산란 높이(SSC-H, 복잡성)을 포함한다. 미토콘드리아가 증가된 크기와 감소된 복잡성을 가지면, 이를 스웰링 표현형을 갖는 것으로 결정하였다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 더 크고 덜 복잡하였다(도 32a).

[0317] mPTP 개방을 유세포 분석을 이용하여 측정하였다. 미토콘드리아를 4 μM 칼세인-AM으로 염색하였다. 미토콘드리아를 최대 30,000가지 사례로 수집하고, 488 nm 레이저로 여기하고, FITC 방출에 대해 평가하였다. 미토콘드리아가 형광 칼세인을 유지할 수 있어서, FITC+ 염색을 초래한 경우, 조절된 mPTP를 갖는 것으로 결정하였다. 미토콘드리아가 형광 칼세인을 유지할 수 없어서, 감소된 FITC 염색을 초래한 경우, 불량조절된, 지속적인 mPTP 개방을 갖는 것으로 결정하였다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 칼세인 AM을 유지할 수 없기 때문에 극적으로 감소된 FITC 방출을 가졌다(도 32b).

[0318] 미토콘드리아 호흡을 평가하기 위해, 시홀스 기구를 사용하여 호흡 조절 비율(RCR)을 결정하였다. ADP-자극된 호흡(RCR) 및 분리된 호흡(RCR최대) 동안 산소 소모율(OCR)로부터 RCR을 계산하였다. 이러한 두 가지 상태의 각각에서 OCR을 기초 OCR로 나누어 OCR 비율을 구하였다. 미토콘드리아 프로토노포어 언커플러 BAM15를 주입하여 최대 호흡을 달성하였다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 극적으로 감소된 ADP-자극 호흡률 및 분리된 호흡률을 가졌다(도 32c).

[0319] 도 33에 도시된 바와 같이, 미토콘드리아 막 전위 및/또는 미토콘드리아 막 투과성을 측정함으로써 단리된 미토콘드리아의 건강 및 기능을 신속하게 평가할 수 있다. 미토콘드리아 JC-1 검정을 사용하는 유세포 분석에 의해 미토콘드리아 막 전위의 변화를 평가하였다. 미토콘드리아를 2 μM JC-1로 염색하고, 최대 30,000가지 사례로 수집하고, 488 nm 레이저로 여기하고, FITC 및 PE 방출에 대해 평가하였다. JC-1 염료는 녹색/FITC(~529 nm)에서 적색/PE(~590 nm)로의 형광 방출 이동에 의해 나타나는, 미토콘드리아에서의 전위-의존적 축적을 나타낸다. 막 전위에-민감성 색 이동은 적색 형광 J-응집체의 농도-의존적 형성으로 인한 것이다. 미토콘드리아 탈분극은 적색:녹색 형광 강도 비율의 감소 또는 PE(적색) 채널의 신호 강도 감소에 의해 나타난다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 감소된 적색:녹색 비율 및 극적으로 감소된 PE 방출을 가졌다(도 33a).

[0320] 포함된 막으로 미토콘드리아에 쉽게 침투하는 시톡스 녹색 핵산 염색을 사용하는 유세포 분석에 의해 완전 미토콘드리아 투과성을 측정하였다. 미토콘드리아를 1 μM 시톡스로 염색하고, 488 nm 레이저로 여기하고, 최대 30,000가지 사례로 수집하고, FITC 방출에 대해 평가하였다. 시톡스 녹색으로 염색된 손상된 미토콘드리아는 시톡스 녹색으로 염색된 비-손상된 미토콘드리아보다 더 높은 FITC 신호 강도를 가질 것이다. 건강한 미토콘드리아에 비해, 손상된 미토콘드리아는 증가된 FITC 방출을 나타내었다(도 33b).

[0321] 종합하면, 이러한 데이터는 단리된 돼지 미토콘드리아의 건강 및 기능이 손상된 미토콘드리아의 표현형 특성을 측정함으로써 신속하게 평가될 수 있음을 보여준다.

[0322] 실시예 9

[0323] 단리된 돼지 미토콘드리아는 -80℃로 저온 보관 후 미토콘드리아 기능을 유지한다

[0324] 단리된 미토콘드리아에 관련한 문헌에 보고된 하나의 중요한 테넌트(tenant)는 기능을 보존하는 방식으로 미토콘드리아를 보관하는 능력이 없다는 것이다. 미토콘드리아를 장기간 보관하는 능력을 테스트하기 위해, 트레할로스 완충액(300 mM 트레할로스, 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.1% 지방산-미포함 BSA, 7.2까지의 pH)에서 현탁시켰고, 하기 두 가지 조건에서 보관되어 있던 미토콘드리아에서 특성화 매개변수(미토콘드리아 스웰링, mPTP 개방, 호흡, 막 전위 및 완전 투과성)를 평가하였다:

[0325] (1) 미토콘드리아 기능에 대해 비-보존인 것으로 여겨지는 4℃에 미토콘드리아 보관; 및

[0326] (2) 미토콘드리아 기능에 대해 보존인 것으로 여겨지는 -80℃에 미토콘드리아 보관.

[0327] 도 34-38에 도시되고 후술하는 바와 같이, 미토콘드리아 크기, 복잡성, mPTP 개방, 호흡, 총 모폴로지 및 HPAEC에서 케모카인 분비를 감소시키는 능력에 의해 결정된 바와 같이, 놀라우면서도 예기치 못하게도 미토콘드리아는 -80℃에서 저온 보관 후 미토콘드리아 기능을 유지하였다.

[0328] 유세포 분석을 이용해 미토콘드리아 스웰링을 평가하여, 비-보존 조건(즉, 4℃에서 보관) 또는 보존 조건(즉, -80℃에서 보관)에서 보관된 미토콘드리아의 FSC-A(크기) 및 SSC-H(복잡성)를 측정하였다. 미토콘드리아가 증가된 크기와 감소된 복잡성을 가졌으면, 스웰링 표현형을 갖는 것으로 결정하였다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 거의 즉시 스웰링 표현형(즉, 크기 증가, 복잡성 감소)을 나타내었지만, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 정상적인 표현형을 유지하였다(도 34a).

[0329] 유세포 분석을 이용하여 미토콘드리아 mPTP 개방을 측정하였다. 미토콘드리아를 4 μM 칼세인-AM으로 염색하였다. 염색된 미토콘드리아를 최대 30,000가지 사례로 수집하고, 488 nm 레이저로 여기하고, FITC 방출을 평가하였다. 미토콘드리아가 형광 칼세인을 유지할 수 있어서, FITC+ 염색을 초래한 경우, 조절된 mPTP를 갖는 것으로 결정하였다. 미토콘드리아가 형광 칼세인을 유지할 수 없어서, 감소된 FITC 염색을 초래한 경우, 불량조절된, 지속적인 개방을 갖는 것으로 결정하였다. 4℃(비-보존 조건)에서 보관된 미토콘드리아는 mPTP 개방을 조절하는 능력을 상실한 반면, -80℃(보존 조건)에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하게 mPTP 개방을 조절하였다(도 34b).

[0330] 비-보존 조건 또는 보존 조건에서 보관된 미토콘드리아의 미토콘드리아 호흡을 평가하기 위해, 시홀스 기구를 사용하여 RCR을 결정하였다. ADP-자극 RCR 및 분리된 호흡(RCR최대) 동안 OCR로부터 RCR을 계산하였다. 이러한 두 가지 상태의 각각에서 OCR을 기초 OCR로 나누어 OCR 비율을 구하였다. 미토콘드리아 프로토노포어 언커플러 BAM15를 주입하여 최대 호흡을 달성하였다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아의 ADP-자극 호흡률 및 분리된 호흡률은 시간이 지남에 따라 감소한 반면, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(6주까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 ADP-자극된 호흡률(도 34c) 및 분리된 호흡률(도 34d)을 가졌다.

[0331] 비-보존 조건(즉, 4℃에서 보관) 또는 보존 조건(즉, -80℃에서 보관)에서 보관된 미토콘드리아의 미토콘드리아 막 전위의 변화를 JC-1 검정을 사용하는 유세포 분석에 의해 평가하였다. 미토콘드리아를 2 μM JC-1로 염색하고, 2를 최대 30,000개의 사례로 수집하였고, 488 nm 레이저로 여기하고, FITC 및 PE 방출에 대해 평가하였다. JC-1 염료는 녹색/FITC(~529 nm)에서 적색/PE(~590 nm)로의 형광 방출 이동에 의해 나타나는, 미토콘드리아에서의 전위-의존적 축적을 나타낸다. 막 전위에-민감성 색 이동은 적색 형광 J-응집체의 농도-의존적 형성으로 인한 것이다. 미토콘드리아 탈분극은 적색:녹색 형광 강도 비율의 감소 또는 PE(적색) 채널의 신호 강도 감소에 의해 나타난다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 막 전위의 극적인 감소를 보인 반면, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 막 전위를 유지하였다(도 35a).

[0332] 포함된 막으로 미토콘드리아에 쉽게 침투하는 시톡스 녹색 핵산 염색을 사용하는 유세포 분석에 의해 비-보존

조건 또는 보존 조건에서 보관된 미토콘드리아의 투과성을 측정하였다. 시톡스 녹색으로 염색된 손상된 미토콘드리아는 시톡스 녹색으로 염색된 비-손상된 미토콘드리아보다 더 높은 FITC 신호 강도를 가질 것이다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는 FITC 방출의 즉각적인 증가를 가졌지만, -80℃에서 보관된 미토콘드리아는 보관 기간 내내(7개월까지) 새로 단리된 미토콘드리아에 필적하는 막 전위를 유지하였다(도 35b).

[0333] 특성화 매개변수의 변화가 기능적 능력의 변화로 해석되는지 여부를 결정하기 위해, HPAEC에서 케모카인 분비를 감소시키는 보관된 미토콘드리아의 능력을 메나디온-유도 ROS 과잉생성 모델을 이용하여 평가하였다. HPAEC를 모든 매개변수에 대한 평가 전에, 5시간 동안 50개 입자/세포에서 미토콘드리아 처리와 동시에 또는 미토콘드리아 처리 없이 25 μM 메나디온과 함께 배양하였다. 본 실험에 사용된 미토콘드리아를 0시간(새로운 미토콘드리아), 24시간, 48시간, 72시간 동안 비-보존 조건(4℃에서 보관) 또는 보존 조건(-80℃에서 보관)에서 보관하였다. 비드-기반 면역검정인, 레전드플렉스(LEGENDplex)™ 인간 전염증성 케모카인 패널(캘리포니아 샌디에고 소재의 바이오레전드(BioLegend)®)을 사용하는 유세포 분석에 의해, 처리된 HPAEC의 배양 배지에서 케모카인을 측정하였다. 비드를 크기와 내부 형광 강도에 의해 구별하였다. 각각의 비드 세트는 표면에서 특정 항체와 접합되었고, 특정 분석물(케모카인)에 대한 포획 비드로 작용하였다. 포획 비드의 선택된 패널이 포획된 항체에 특이적인 표적 분석물을 함유하는 샘플과 혼합되고 항온처리될 때, 각각의 분석물은 특정 포획 비드에 결합할 것이다. 세척 후, 비오틴화된 검출 항체 칵테일을 첨가하고 칵테일의 각각의 검출 항체는 포획 비드에 결합된 특정 분석물에 결합하여 포획 비드-분석물-검출 항체 샌드위치를 형성할 것이다. 스트렙타비딘-피코에리트린(SA-PE)을 후속하여 첨가하였고, 이는 비오틴화된 검출 항체에 결합하여, 결합된 분석물의 양에 비례하여 형광 신호 강도를 제공할 것이다. 비드가 유세포 분석기에서 크기 및 내부 형광 강도에 의해 구별되었기 때문에, 분석물-특이적 집단을 분리할 수 있었고, PE 형광 신호를 정량화할 수 있었다. 동일한 검정에서 생성된 표준 곡선을 이용하여 관심 분석물의 농도를 결정하였다.

[0334] 비드-기반 면역검정에 의해 분석된 케모카인은 IL-8/CXCL8, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 및 GROα/CXCL1을 포함한다. IL-8은 호중구에 대해 뚜렷한 특이성을 갖는 주화인자 사이토카인(즉, 케모카인)이다. IL-8은 호중구를 염증 사이트로 유인한 후, 이들을 활성화시키기 위해 조력한다. MIG는 활성화된 T 세포를 염증 사이트로 동원하는 데 중요한 역할을 하는 케모카인이다. MIG는 Th1/Th2 분극화(Th1 세포를 유인하고 Th2 이동을 억제함)에 참여한다. MIG는 IFN-γ 신호의 증폭 후에 생성되며, 활성화를 위한 유용한 판독값으로 작용할 수 있다. MCP-1은 염증 사이트로의 단핵구 및 대식세포의 동원을 제어하는 케모카인이다. GROα는 염증의 초기 단계에서 호중구의 동원을 제어하는 케모카인이다.

[0335] 비드-기반 면역검정의 결과는 25μM 메나디온 + 0 미토콘드리아/세포로 처리된 세포에 대한 퍼센트 향상으로 도 36에 제시된다. 4℃에서 보관된 미토콘드리아는, 케모카인 분비를 감소시키는 능력을 유지한 -80℃에서 보관된 미토콘드리아에 비해, IL-8/CXCL8(도 36a), MIG/CXCL9(도 36b), MCP-1/CCL2(도 36c) 및 GROα/CXCL1(도 36d)의 분비를 조절하는 능력을 빠르게 상실하였다. 이러한 결과는 단리된 돼지 미토콘드리아가 -80℃에서 저온 보관 후 미토콘드리아 기능을 유지한다는 것을 보여준다.

[0336] 도 37에 도시된 바와 같이, -80℃에 보관된 미토콘드리아는 새로 단리된 미토콘드리아와 동일한 전체 몰폴로지(도 37a) 및 평균 크기(도 37b)를 가진다. 클래스 I로 채점된 미토콘드리아는 연속적인 전자 밀도 바탕질 공간에서 수많은 협소한 다형성 크리스테로 표현되는 응축된, 정상 상태(즉, 비-손상 상태)를 가졌다. 클래스 II로 채점된 미토콘드리아는 재구성된 크리스테 및 바탕질 공간을 특징으로 하는 리모델링 상태에 있었다. 리모델링 상태의 출현은 막간공간으로부터의 사이토크롬 c의 재분배 및 가용성과 일시적으로 상관관계가 있다. 클래스 III로 채점된 미토콘드리아는 스웰링되고 손상되었다. 클래스 III 미토콘드리아는 온전한 막을 가졌지만, 이러한 미토콘드리아의 크리스테는 악화되어 있고 미토콘드리아의 주변부 가까이에 모여있다. 클래스 IV로 채점된 미토콘드리아는 말기에 스웰링되거나 파열되었다.클래스 IV 미토콘드리아는 바탕질의 비대칭 수포를 포함하여, 전체 몰폴로지적 교란을 보였다. "간결한 바탕질(CM)"로 채점된 미토콘드리아는 제한적인 외막이 없는 간결한 바탕질을 가졌다.

[0337] 온전한 미토콘드리아가 미토콘드리아 처리에서 기능적 구성요소인지 여부를 평가하기 위해, -80℃에서 2주 동안 보관된 미토콘드리아로부터 원심분리에 의해 미토콘드리아 및 비-미토콘드리아 분획을 수득하였다. HPAEC를 25 μM 메나디온과 함께 배양하고, 미토콘드리아 분획 또는 비-미토콘드리아 분획으로 체적측정하여 처리하였다. 0.02%, 0.2%, 2% 및 20%의 부피는 각각 1개 미토콘드리아/세포, 10개 미토콘드리아/세포, 100개 미토콘드리아/세포 및 1,000개 미토콘드리아/세포에 해당한다. 분석된 매개변수는 염증성 케모카인 IL-8/CXCL8(도 38a), MCP-1/CCL-2(도 38b) 및 GROα/CXCL-1(도 38c)의 분비뿐만 아니라 세포 손상을 시사하는 락테이트 데하이드로게나제

(LDH) 방출(도 38d)을 포함하였다. 모든 결과는 25 μM 메나디온 및 0 미토콘드리아/세포(0% 부피)로 처리된 HPAEC에 대해 퍼센트 향상으로 도 38에 제시된다. 미토콘드리아 분획이 단독으로 케모카인 분비 및 LDH 방출을 감소시키는 능력을 보유하였다. 따라서, 미토콘드리아는 -80℃에서 보관한 후 미토콘드리아로부터 방출되거나 단리 과정으로부터 이전되는 구성요소와는 대조적으로 미토콘드리아 처리의 기능적 구성요소이다.

[0338] 실시예 10

[0339] 보존 조건에서 장기간 보관된 단리된 돼지 미토콘드리아는 *생체내* 신장 기능 및 회복을 향상시킨다

[0340] 허혈/재관류(I/R) 마우스 모델을 이용하여, 장기간 보존 조건에서 보관된 단리된 되지 미토콘드리아의 *생체내* 신장 기능 및 회복을 향상시키는 능력을 평가하였다. 본 연구에 사용된 미토콘드리아를 마우스에 주입하기 전에 -80℃(보존 조건)에서 대략 1개월 동안 보관하였다. 45분 동안 신장 동맥을 클램핑한 후 재관류하여 성체 마우스에서 급성 I/R 손상을 달성하였다. 1일 차에 재관류 시, 미토콘드리아(0.01x 또는 0.1x 투여량) 또는 비히클 대조군을 마우스에 주입하였다. 도 39a에 도시된 바와 같이, 신장 기능의 지표인 혈중요소질소(BUN)는 I/R 손상 후 증가하였고, 미토콘드리아 주입(0.1x 투여량) 후 2일 및 4일 차에 감소하는 경향이 있었다. 신장에 의해 흡수된 마우스 중량 퍼센트인 신장 지수는 도 39b에 도시된 바와 같이, I/R 손상 후에 증가하였고, 미토콘드리아 주입(0.01x 투여량) 후에 감소하였다. 신장 손상 분자-1(KIM1)은 급성 신손상의 마커이다. 도 39c는, I/R 손상이 KIM1 혈청 수준을 증가시킨 반면, 미토콘드리아 처리는 투여량-반응 방식으로 이러한 수준을 감소시켰음을 보여준다. 단핵구 주화인자 단백질 1(MCP1)은 급성 신손상과 관련된 전염증성 사이토카인이다. 도 39d는 I/R 손상이 MCP1 혈청 수준을 증가시킨 반면, 미토콘드리아 처리는 투여량-반응 방식으로 이러한 수준을 감소시켰음을 보여준다. 컴플리먼트 시스템의 C3a 및 C5a 구성원은 저산소/재산소화 후 신세뇨관 상피 세포와 대식세포 모두에서 염증 매개체를 유도한다. I/R 손상이 C3a(도 39e) 및 C5a(도 39f)의 혈청 수준을 증가시킨 반면, 미토콘드리아 처리는 이러한 수준을 투여량-의존 방식으로 감소시켰다(도 39e-f).

[0341] 종합하면, 이러한 데이터는 보존 조건에서 장기간 보관된 단리된 돼지 미토콘드리아를 대상체에 투여하여, 손상 후 신장 기능 및 회복을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

[0342] 실시예 11

[0343] 단리된 돼지 미토콘드리아를 이용한 치료는 손상 후 폐 기능을 향상시킨다

[0344] 돼지 폐를 팽창시키고 기관을 클램핑하여, *생체외* 폐 관류(EVLP)를 위한 폐를 준비하였다. EVLP 전에 대략 20시간 동안 섭씨 4도에서 폐를 보관하였다. 얼음 위에서 폐 동맥(PA) 및 주기관지(기관)에 캐뉼러를 삽입하였다. 좌심방(LA)을 개방한 채로 두어, 폐로부터 관류액의 자유로운 유출을 가능하게 하였다. 5-시간 EVLP 동안, 폐를 환기시키고, 중탄산염으로 완충되었고 5% CO_2, 95% N_2로 탈산소화된 37℃의 스틴 용액으로 관류하였다. 25 cmH_2O의 압력 캡으로 부피 제어된 환기를 이용하였다. PA 관류를 100 ml/분으로 시작하였고, 대략 30-45분에 걸쳐 30%의 심박 출량으로 증가시켰다. EVLP를 하는 동안 관류를 일정하게 유지하였다. 미토콘드리아 주입 전에, 100%의 FiO_2에서 PA 및 LA PO_2를 측정하여 가스 교환을 평가하였다. 동적유순도와 같은, 생리학적 매개변수도 이 시점에 기록하였다. 미토콘드리아 또는 호흡 완충액(대조군)을 기준선 직후와 EVLP 3시간 후에 PA 라인에 주입하였다. 가스 교환을 포함한 EVLP 평가를 기준선 후 15분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 5시간에 수행하였다. 본 실험에 사용된 미토콘드리아를 사용 전 보존 조건(-80℃에서 보관)에서 보관하였다(보관소에서 24시간 내지 1개월).

[0345] 대략 20시간의 저온 허혈 시간 후에 단리된 돼지 사체의 폐에서 EVLP를 실행하였다. 도 40에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리아 처리는, 저온 허혈 손상 후 EVLP에 놓여 있는 단리된 돼지 사체의 폐에서 간극 연접 마커의 발현을 향상시켰고, DNA 산화를 감소시켰다. 특히, 미토콘드리아 처리는 위엽에서 1시간 후 그리고 미엽의 원위 분절, 미엽의 근위 분절 및 위엽에서 측정했을 때, 4시간 후에, EVLP에서 간극 연접 마커 JAM 1(도 40a) 및 CD31(도 40b)의 발현을 향상시켰다. 미토콘드리아 처리는 또한 위엽에서 1시간 후 그리고 미엽의 원위 분절, 미엽의 근위 분절, 아래엽 및 위엽에서 측정했을 때, 4시간 후에 EVLP 중 폐 조직에서 ROS-유도 DNA 활성화 마커 8-OHdG의 발현을 감소시켰다(도 40c).

[0346] 폐 조직을 4℃에서 밤새 보관한 후, 폐 조직 균질액을 제조하였다. 균질액을 미토콘드리아의 투여량을 증가하면서 처리하고, 표준 배양 조건에서 밤새 항온처리하였다. 도 41a-b에 도시된 바와 같이, 돼지 미토콘드리아 처리는 저온 허혈 손상 후, 단리된 돼지 사체의 폐에서 염증성 사이토카인 발현 또는 분비를 감소시켰다. 특히, 미토콘드리아 처리는 EVLP 중 순환 IL-6을 감소시켰고(도 41a), 위엽에서 EVLP 1시간 후 그리고 미엽의 원위

분절, 미엽의 근위 분절 및 위엽에서 EVLP 4시간 후에, IL-8의 폐 조직 용해물 수준을 감소시켰다(도 41b).

[0347] 단리된 돼지 사체의 폐의 폐 혈관 저항PVR)을 EVLP 중 측정하였다. 6개의 폐("대조군")를 3시간의 EVLP 시간에 비히클로 처리하였고, 5개의 폐를 3시간의 EVLP 시간에 미토콘드리아("Mitochondria")로 처리하였으며, 이들을 분석에 포함시켰다(도 42a). 단일 미토콘드리아-처리된 폐가 도 42b에 도시되며, 이는 어떻게 미토콘드리아 주입이 3-시간 주입에서 시각적으로 확인될 수 있는지 나타낸다. 도 42a 및 도 42b의 점선은 미토콘드리아 주입 시간을 나타낸다. 도 42b의 화살표는 가스 교환이 평가된 시간을 나타낸다. 각 평가 사이에는 동원 사례가 있었다. 이러한 결과는 EVLP 중 미토콘드리아 주입이 PVR을 감소시킴으로써 폐 기능을 향상시켰음을 보여준다.

[0348] 또한, 미토콘드리아 처리가 신호전달 경로에 미치는 영향을 평가하였다. 단리된 돼지 사체의 폐를 대략 20시간의 저온 허혈 시간에 노출시켰고, 그 후 EVLP를 5시간 동안 폐에 실행하였다. 원위 미부 및 근위 미부 폐 조직을 대조군 완충액 주입 폐 또는 미토콘드리아 주입 폐로부터 수집하고, RNA 시퀀싱을 수행하였다. 도 43에 도시된 바와 같이, 미토콘드리아 처리는 저온 허혈 손상 후 EVLP에 놓여진 폐에서 염증 및 세포자살 신호전달 경로를 감소시켰다.

[0349] 종합하면, 이러한 결과는 단리된 돼지 미토콘드리아를 이용한 폐의 처리가 간극 연접 마커의 발현을 증가시키고 DNA 산화, 염증성 사이토카인 생성, 세포자살 및 PVR을 감소시킴으로써 손상 후 폐 기능을 향상시킨다는 것을 보여준다. 이와 같이, EVLP 중에 돼지 미토콘드리아 처리를 실행하여, 폐 생존력과 기능을 향상시킬 수 있다.

[0350] 실시예 12

[0351] 미토콘드리아 처리는 손상 또는 고통스러운 조건에 노출된 세포 또는 장기 조직의 생존력과 기능을 향상시킨다

[0352] 건강한 세포는 정상적으로 기능하기 위해 엄격하게 조절된 양의 ROS를 필요로 한다. ROS 생성이 특정 수준을 넘어서 증가하면, 세포에 손상을 입히고, 핵산, 지질 및 단백질을 포함하는, 세포 구성요소에 ROS-매개 손상을 야기한다. 미토콘드리아 처리가 ROS 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해, HPAEC를 미토콘드리아 미처리 또는 처리된 25 μM의 ROS-유도제 메나디온과 함께 5시간 동안 배양하였다. 산화 스트레스 마커 4-HNE 및 8-OHdG를 경쟁 ELISA에 의해 처리된 세포의 용해물에서 측정하였다. 도 44a-44b에 도시된 바와 같이, 미토콘드리아 처리는 4-HNE 부가물 및 8-OHdG의 수준을 정상(메나디온 미처리) 수준으로 효과적으로 감소시켰다. 처리된 세포의 세포 배양 상청액을 유세포 분석에 의해 분비된 케모카인의 존재에 대해 분석하였다. 도 44c-44e에 도시된 바와 같이, 미토콘드리아 처리는 IL-8/CXCL8, MCP1/CCL2, MIG/CXCL9 및 GROα/CXCL1의 분비를 정상(메나디온 미처리) 수준으로 효과적으로 감소시켰다. 본 실험에 사용된 미토콘드리아를 사용 전 1주 동안 -80℃에서 보관하였다.

[0353] ROS-매개 손상에 외에도, 이식 예정된 장기는 종종 저온/재가온 손상을 입는다. 세포 수준에서, 온도가 감소하면, 세포는 대사 기능을 변경하고, 이들의 ATP 저장분을 고갈시킨다. 세포나 장기가 재가온됨에 따라 ATP 수요와 소모가 증가한다. 미토콘드리아 수준에서는, 막 전위의 후속 손실 및 산화 스트레스의 증가와 함께, mPTP의 장기간 개방이 있다. 세포가 ATP의 저장분을 고갈시키기 때문에, 정기적인 세포 대사를 시동(jumpstart)할 준비가 되지 않고, 이는 세포 손상, 괴사체(necrosome)의 개시 및 활성화 및 종국의 죽음/파열 및 세포 함유물 누출을 유발하여, 강력한 염증 반응을 초래한다. 2차원(2D) 배양 모델에서 손상을 재현하기 위해, 도 45에 도시된 바와 같이, HPAEC를 4℃에서 24시간 동안 배양(저온 조건)하고, 37℃에서 4시간 동안 재가온(정상온도 조건)하였다. 치료 군은 저체온증의 발병 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC 및 재가온 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC를 포함하였다. 4-시간 재가온 기간 후, HPAEC 용해물에서 4-HNE 단백질 부가물 정량화를 위해 4-HNE 부가물 경쟁 ELISA를 이용하여 ROS-매개 손상을 측정하였다. 매우 낮은 투여량의 미토콘드리아가 영향을 미칠 수 있었는바, 4-HNE 부가물 형성은 미토콘드리아 처리에 대해 매우 민감하였다(도 45b). 또한, 4-시간 재가온 기간 후에 세포 생존력을 측정하였다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 상대적 발광 단위(RLU)로서 도 45c에 도시된다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 HPAEC에 비해 세포 생존력에서 2-3배 증가를 산출하였다(도 45c).

[0354] 또한, 미토콘드리아 처리가 저온/재가온 손상을 받은 HPAEC의 괴사에 미치는 영향을 도 45a에 도시된 2D 배양 모델을 이용하여 평가하였다. 치료 군은 저체온증 발병 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC 및 재가온 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC를 포함하였다. 4-시간 재가온 기간 후, 세포 불침투성인, 전형광성 DNA 염료를 사용하여 괴사성 세포 죽음을 측정하였다. 살아있는 세포는 이러한 염료를 거부할 것이지만, 막 무결성이 손상된 괴사성 세포는 염료의 진입을 허용할 것이다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 상대적 발광 단위(RLU)로서 도 46a에 도시된다. 스트레스가 가해지지 않은 정상적인 HPAEC

는 점선으로 도 46a에 표시된다. 미토콘드리아로 처리된 HPAEC는 괴사의 투여량-의존적 감소를 보여주었다(도 46a).

[0355] 괴사성 세포 죽음의 특징은 MLKL의 인산화이다. 도 45a에 도시된 2D 배양 모델에서 4-시간 가온 기간 후에 수집된 HPAEC 용해물을 샌드위치 ELISA를 이용해 분석하여, 인산-MLKL(pMLKL) 및 전체 MLKL을 측정하였다. 96웰 플레이트에 항-범(anti-pan) MLKL 항체를 코팅하였다. 선택된 웰에서, 토끼 항-인산-MLKL(Ser358/345) 항체를 첨가하여 인산화된 MLKL을 검출하였다. 나머지 웰에서, 토끼 항-범 MLKL 항체를 사용하여 범 MLKL을 검출하였다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 450 nm의 파장에서 측정된 광학 밀도(OD_{450})로 도 46b에 도시된다. 스트레스가 가해지지 않은 정상적인 HPAEC는 점선으로 도 46b에 표시된다. 미토콘드리아로 처리된 HPAEC는 pMLKL 수준에서 투여량-의존적 감소를 보여주었다(도 46b). 총 MLKL 수준은 변경되지 않았다(데이터는 표시하지 않음).

[0356] 하이 모빌리티 군 박스 1(HMGB-1)은 괴사를 겪는 세포에서 수동적으로 방출되는 유비쿼터스 핵 단백질이다. 도 45a에 도시된 2D 배양 모델에서 HPAEC 배양 상청액에서 방출된 HMGB-1을 샌드위치 ELISA에 의해 측정하였다. 도 46c에 도시된 결과를 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화하였다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 세포에 비해 HMGB-1 방출을 감소시켰다(도 46c). 락테이트 데하이드로게나제(LDH)는 세포 용해 시 방출되는 안정적인 사이토솔 효소이다. HPAEC 배양 상청액에서 방출된 LDH를 30-분 결합 효소 검정으로 측정하였고, 그 결과 테트라졸륨 염(INT)이 적색 포르마잔 산물로 전환되었다. 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화된 490 nm의 파장에서 측정된 광학 밀도(OD_{490})로 도 46d에 도시된다. 스트레스가 가해지지 않은, 정상적인 HPAEC 대조군은 점선으로 도 46c에 표시된다. 미토콘드리아 처리는 미처리된 세포에 비해 LDH 방출을 감소시켰다(도 46d).

[0357] 도 45a에 도시된 2D 배양 모델로부터 수득된 세포 용해물을 사용하는 발광 ATP 검출 검정에 의해, 미토콘드리아 처리가 저온/재가온 손상을 받은 HPAEC에서 ATP의 총 세포 수준에 미치는 영향을 평가하였다. 발광 ATP 검출 검정은 세포 ATP의 총 수준을 검출할 수 있게 하며, ATP와 파이어플라이 루시페라제 및 루시페린의 반응으로 인한 광의 생성에 기반한다. 방출된 광은 세포 내부의 ATP 농도에 비례한다. ATP 분해 효소(즉, ATP아제)는 본 검정의 세포 용해 단계 동안 비가역적으로 비활성화되어, 수득된 발광 신호가 ATP의 내인성 수준에 실제로 해당하는 것을 보장하였다. 치료 군은 저체온증의 발병 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC 및 재가온 시 미토콘드리아로 처리된 HPAEC를 포함하였고, 4-시간 재가온 기간 후, 세포 ATP의 총 수준을 측정하였다. 도 47a에 도시된 결과는 기준선(즉, 미토콘드리아 처리 없이 저온/재가온에 노출된 HPAEC)에 대해 정규화되었다. 미토콘드리아 처리된 HPAEC는 미처리된 세포에 비해 ATP 농도가 증가하였다(도 47a). 증가된 ATP 농도와 세포 생존력 사이에 양의 상관관계가 있었고(도 47b), 증가된 ATP 농도와 괴사 사이에는 음의 상관관계가 있었다(도 47c). 이러한 결과는 미토콘드리아 처리가 저온/재가온 손상을 받은 세포에서 세포 ATP의 총 수준을 증가시키고, 이는 향상된 세포 생존력과 상관관계가 있음을 보여준다.

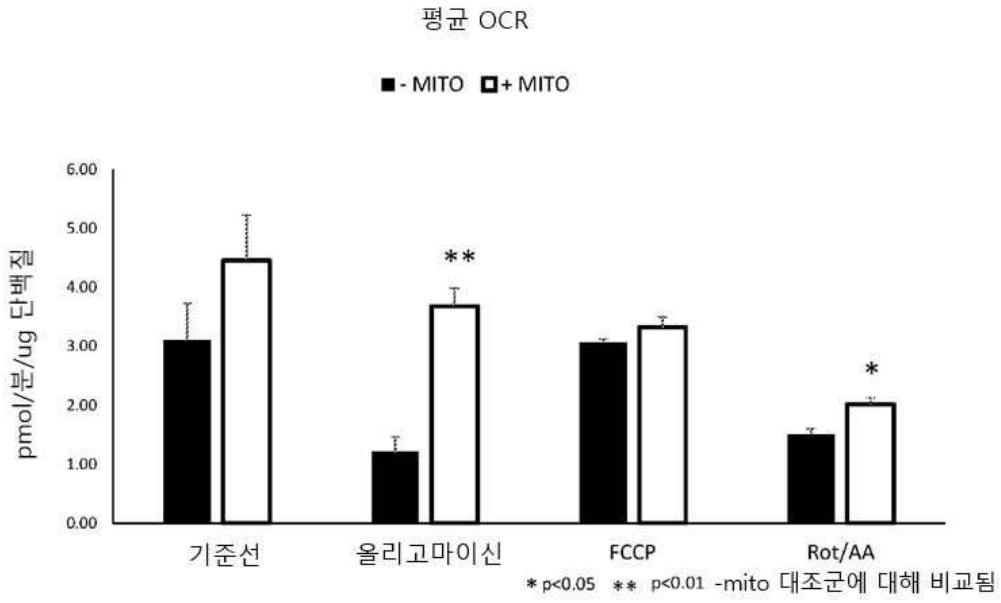
[0358] 미토콘드리아 처리가 세포 생존력, 괴사 및 사이토카인 분비에 미치는 영향을 폐 균질액에서 평가하였다. 세포 생존력 및 괴사를 평가하기 위해, 폐의 원위 조각을 저온 보관에서 24시간 후에 수집하고, 0.1 mg/mL의 DN아제 I/0.01% 콜라게나제 용액에서, 효소적으로 소화산물화하고, 미토콘드리아로 처리하고, 평가 전 4시간 동안 정상 온도(재가온) 세포 배양 조건에 두었다. 미토콘드리아 처리(500-입자/mg 또는 100-입자/mg)는 습윤 조직 중량을 기준으로 하였고, 본원에 기재된 EVLP 실험에 사용된 투여량과 유사하였다. 미처리된 폐 균질액에 비해, 미토콘드리아 처리는 유의미하게 세포 생존력을 향상시켰고(도 48a), 괴사를 감소시켰다(도 48b). 사이토카인 분비를 평가하기 위해, 폐 조직을 4℃에서 밤새 보관한 후, 폐 조직 균질액을 제조하였다. 균질액을 미토콘드리아의 투여량을 증가시키면서 처리하고, 표준 배양 조건(37℃)에서 밤새 항온처리하였다. 도 49에 도시된 바와 같이, 미토콘드리아 처리는 저온 노출 및 균질화 후 IL-6 및 IFN-γ의 분비를 감소시켰다.

[0359] 종합하면, 본 결과는 미토콘드리아 처리가 ROS-매개 산화 부산물 생성, ROS-매개 케모카인 분비 및 세포 및 장기 조직의 저온/재가온 손상을 감소시킨다는 것을 보여준다. 이와 같이, 세포 또는 장기 조직이 저체온증과 같은, 손상 또는 고통스러운 조건에 노출되기 전 또는 후에, 세포 또는 장기 조직을 미토콘드리아로 처리하는 것에 이점이 있다.

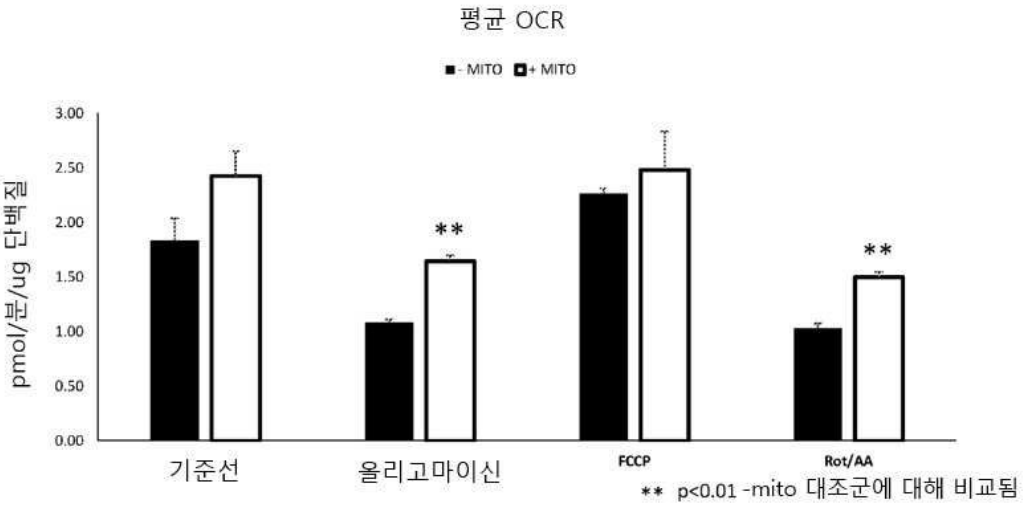
[0360] * * *

도면

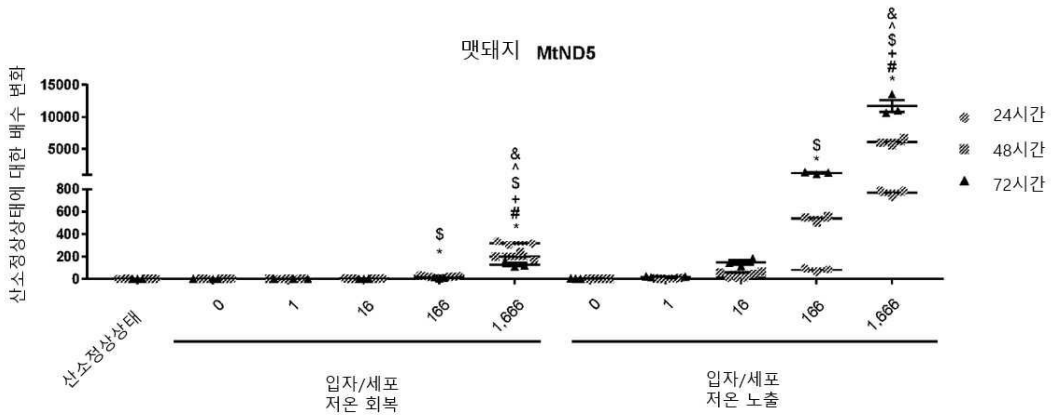
도면1


평균 OCR
■- MITO □+ MITO
pmol/분/ug 단백질
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
**
*
기준선
올리고마이신
FCCP
Rot/AA
* p<0.05 ** p<0.01 -mito 대조군에 대해 비교됨

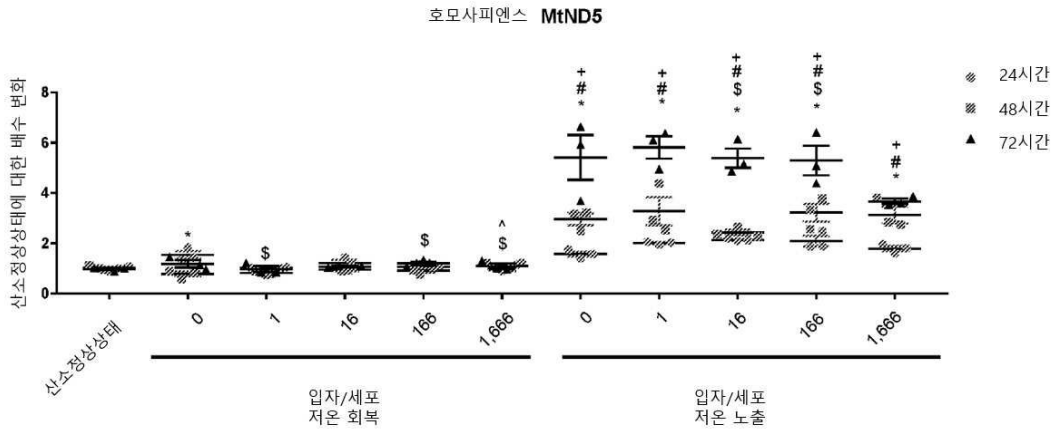
도면2


평균 OCR
■- MITO □+ MITO
pmol/분/ug 단백질
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
**
**
기준선
올리고마이신
FCCP
Rot/AA
** p<0.01 -mito 대조군에 대해 비교됨

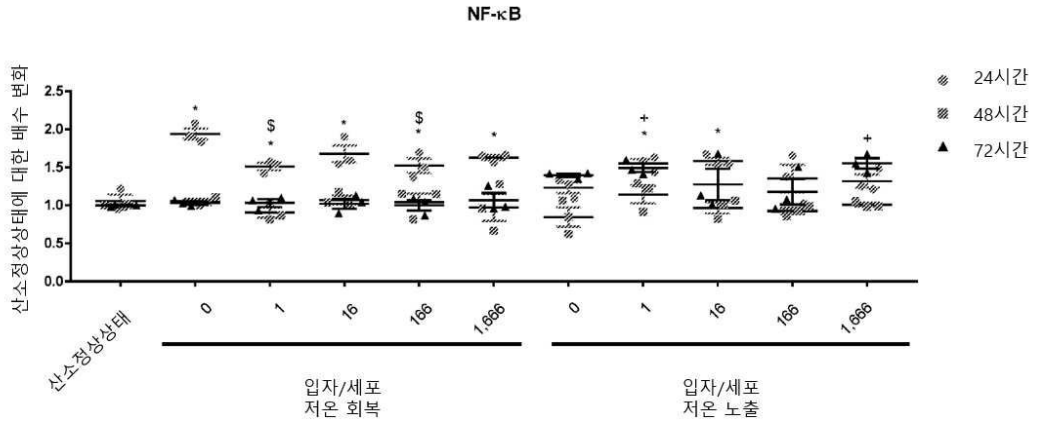
도면3


맷돼지 MtND5
산소정상상태에 대한 배수 변화
15000
10000
5000
800
600
400
200
0
24시간
48시간
72시간
산소정상상태
0
1
16
166
1,666
입자/세포
저온 회복
입자/세포
저온 노출

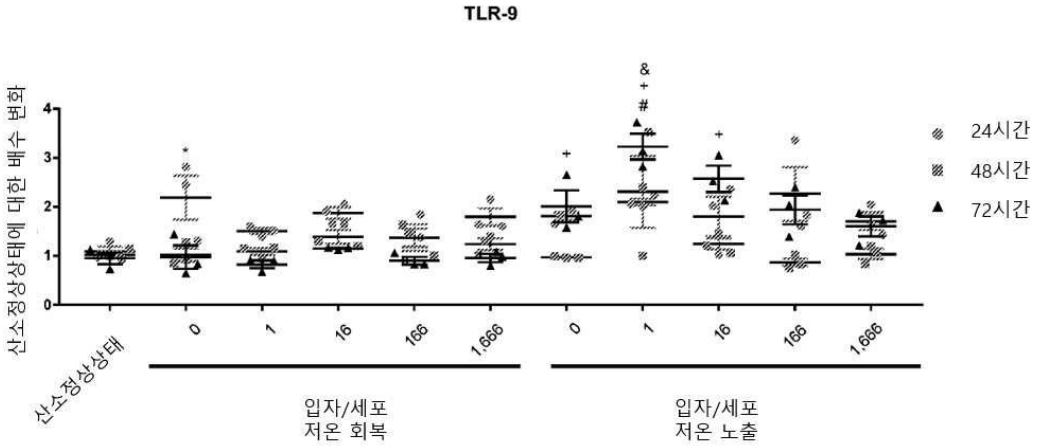
도면4


호모사피엔스 MtND5
산소정상상태에 대한 배수 변화
8
6
4
2
0
24시간
48시간
72시간
산소정상상태
0
1
16
166
1,666
입자/세포
저온 회복
입자/세포
저온 노출

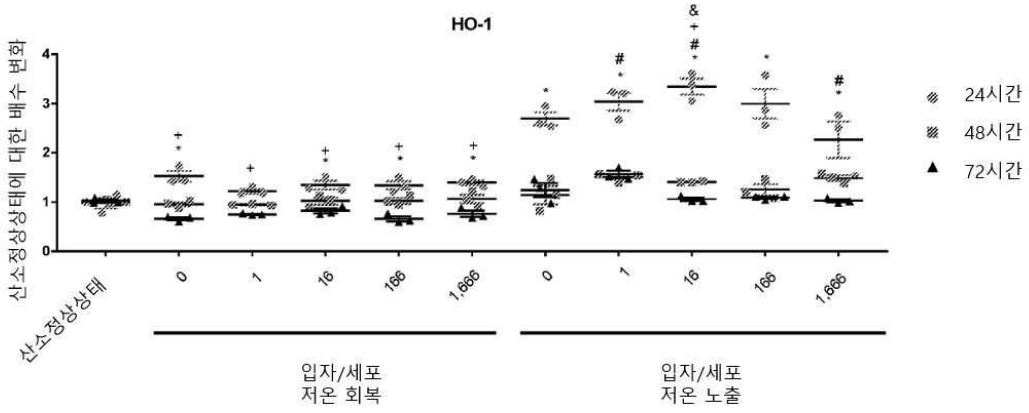
도면5


NF-κB
산소정상상태에 대한 배수 변화
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
24시간
48시간
72시간
산소정상상태
0
1
16
166
1,666
입자/세포
저온 회복
입자/세포
저온 노출

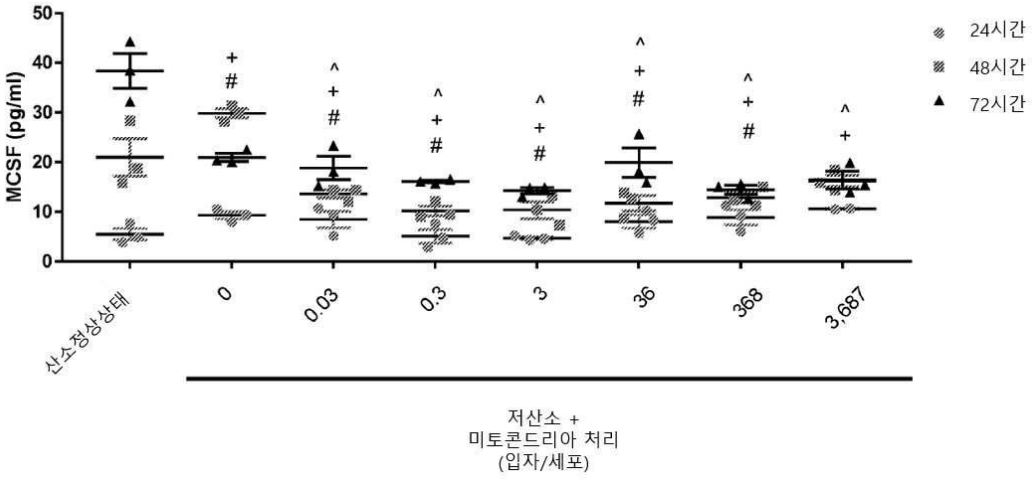
도면6


TLR-9
산소정상상태에 대한 배수 변화
24시간
48시간
72시간
산소정상상태
0
1
16
166
1,666
입자/세포
저온 회복
입자/세포
저온 노출

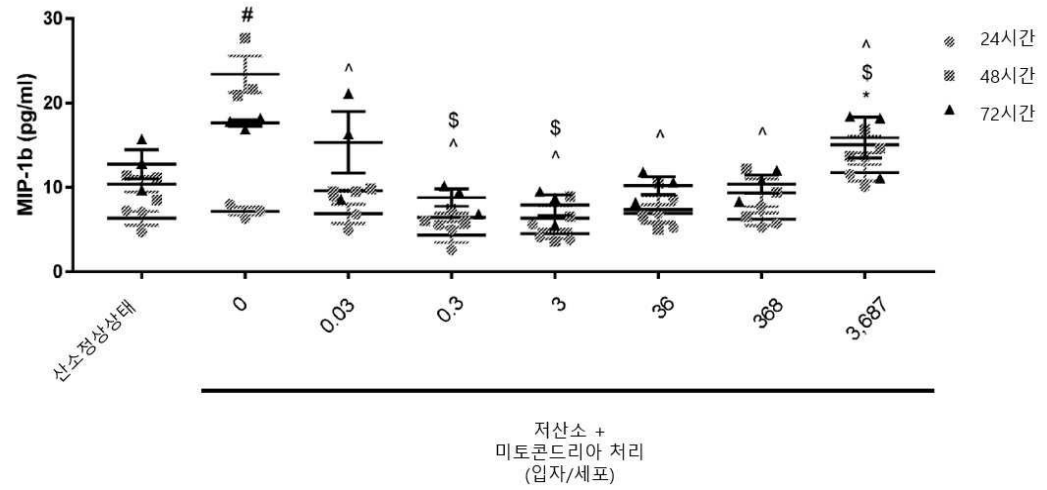
도면7


HO-1
산소정상상태에 대한 배수 변화
24시간
48시간
72시간
산소정상상태
0
1
16
166
1,666
입자/세포
저온 회복
입자/세포
저온 노출

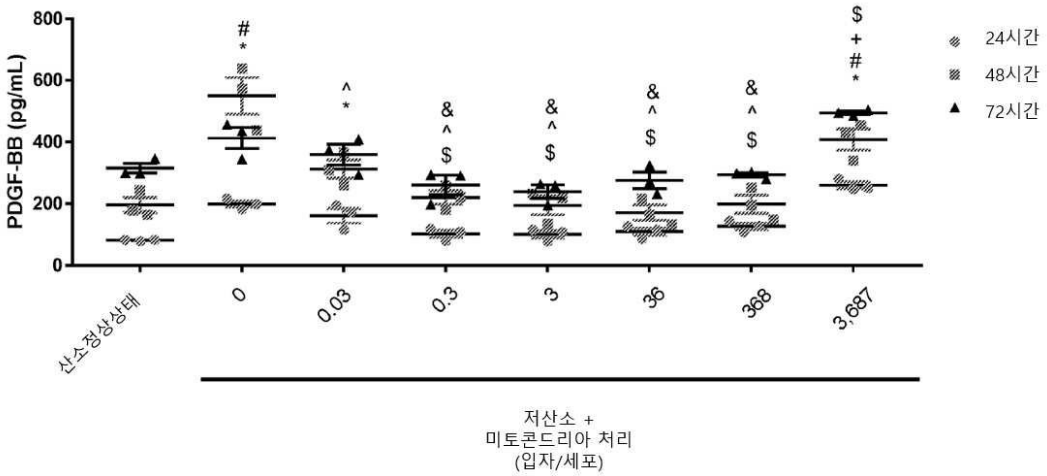
도면8


MCSF (pg/ml)
24시간
48시간
72시간
산소정상상태
0
0.03
0.3
3
36
368
3,687
저산소 +
미토콘드리아 처리
(입자/세포)

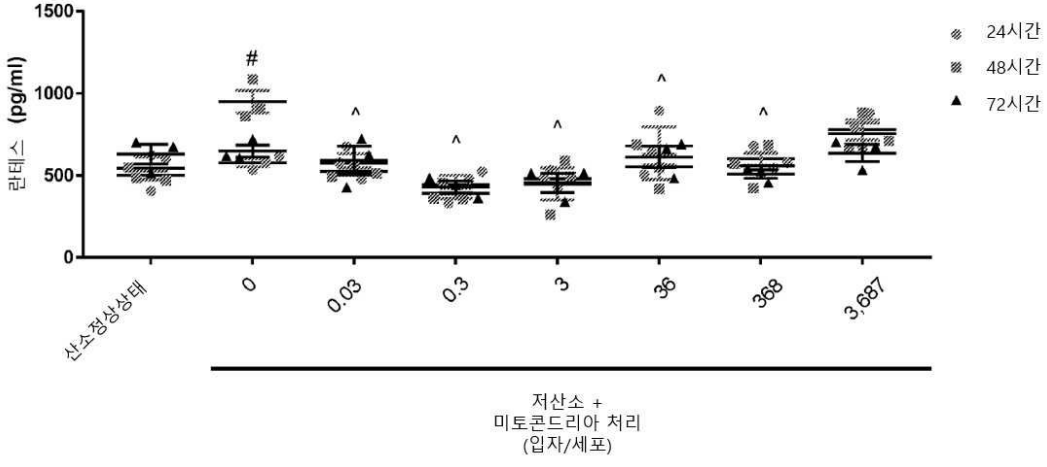
도면9



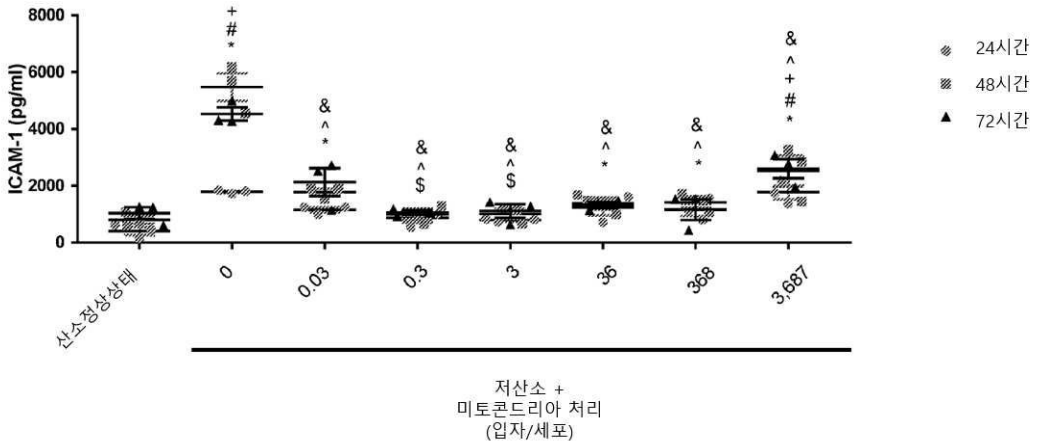
도면10



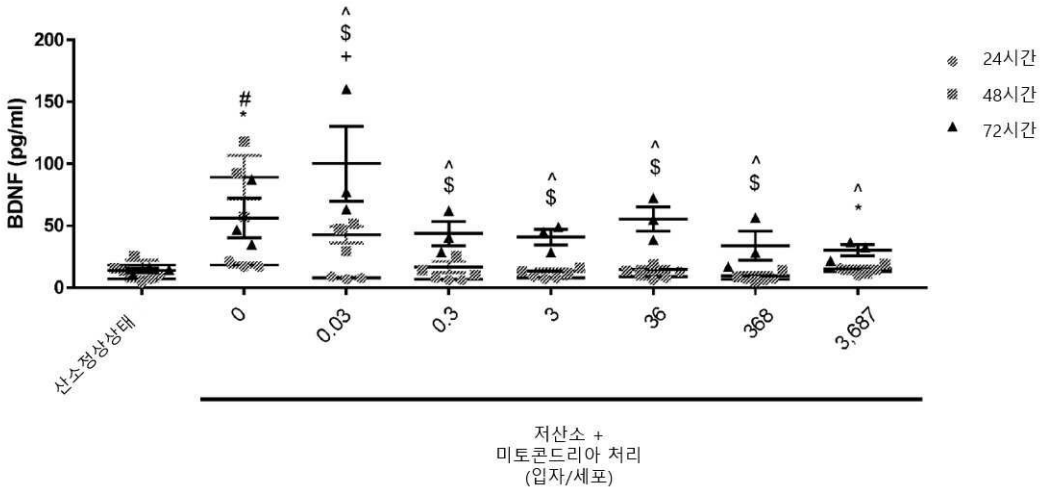
도면11



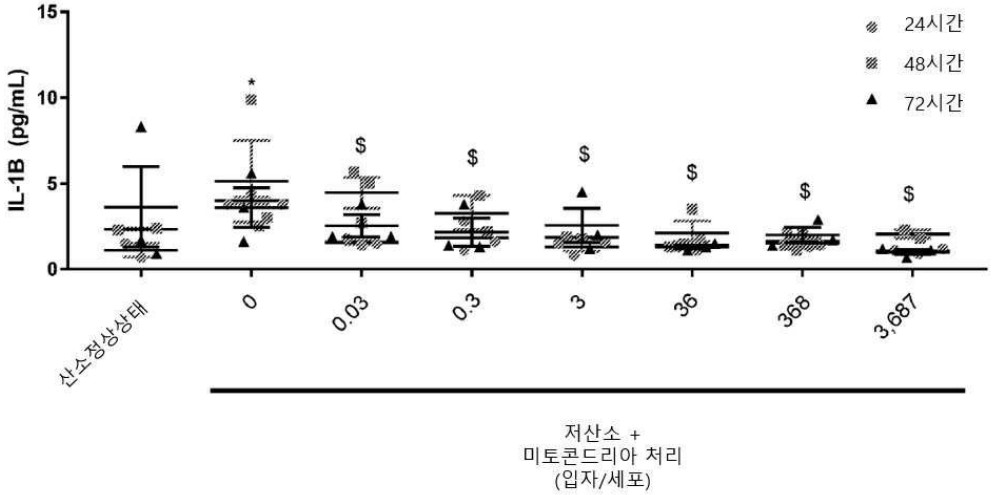
도면12



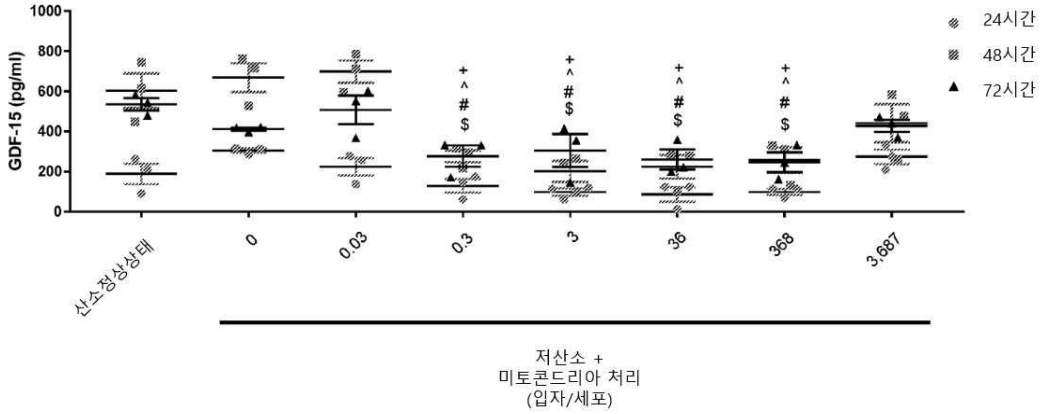
도면13



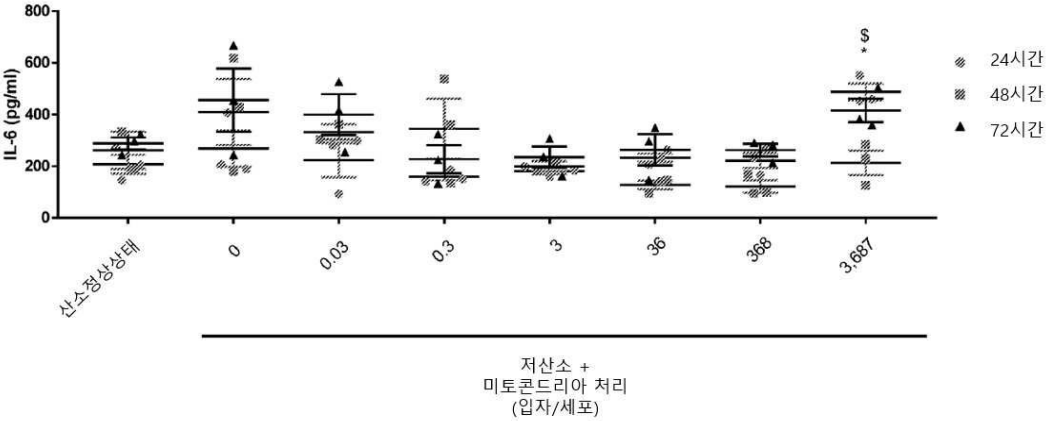
도면14



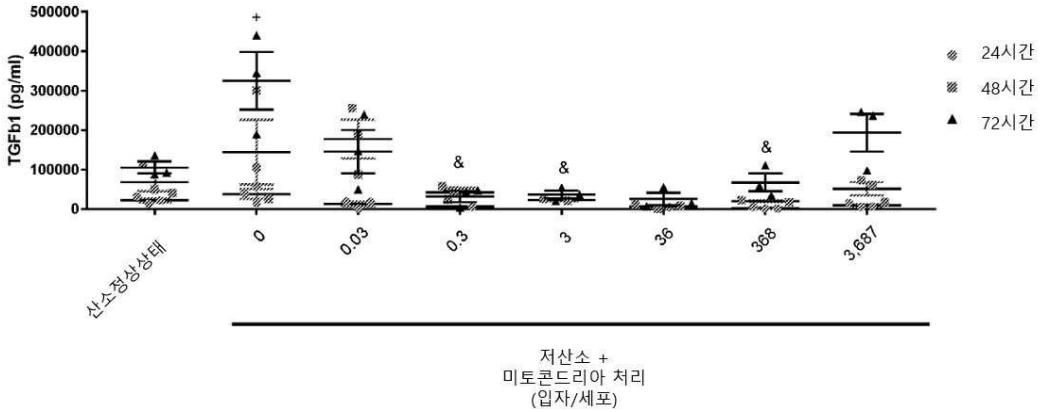
도면15



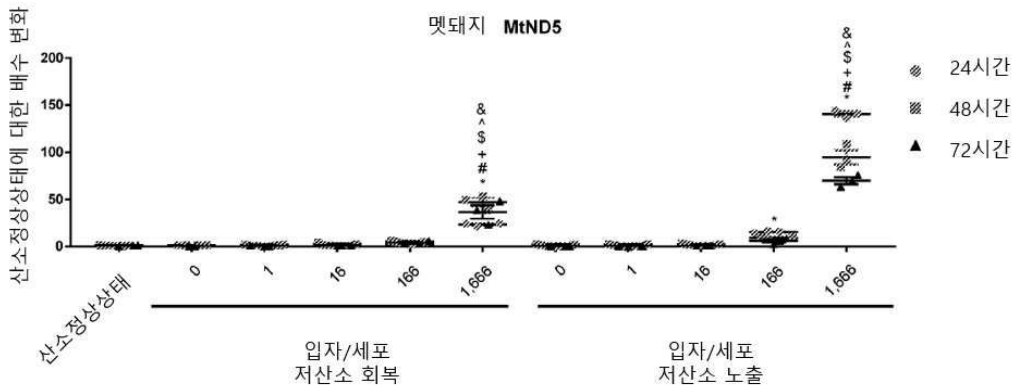
도면16



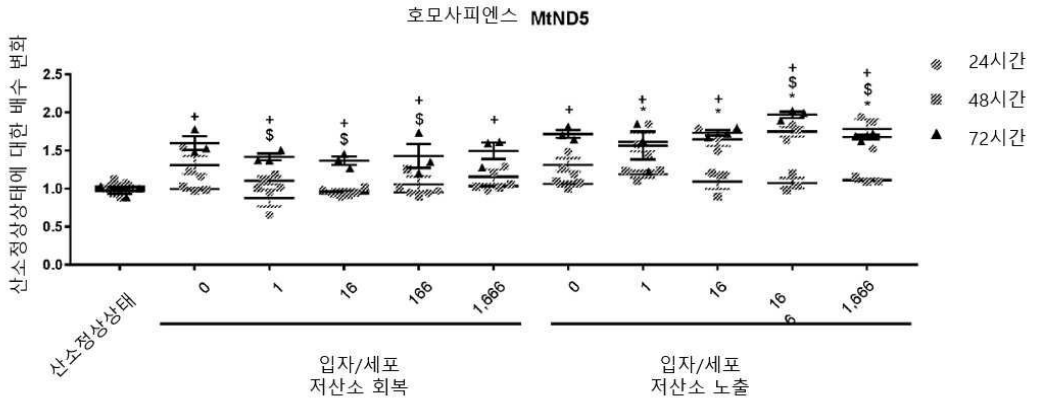
도면17



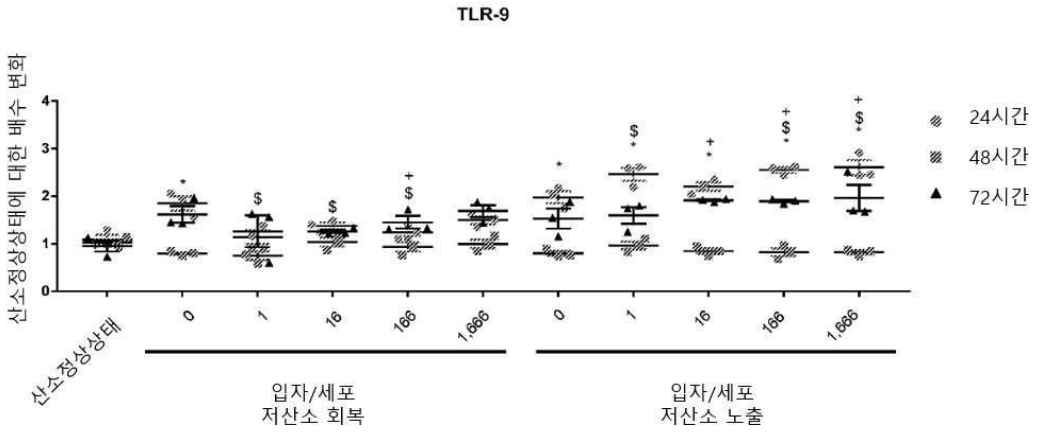
도면18



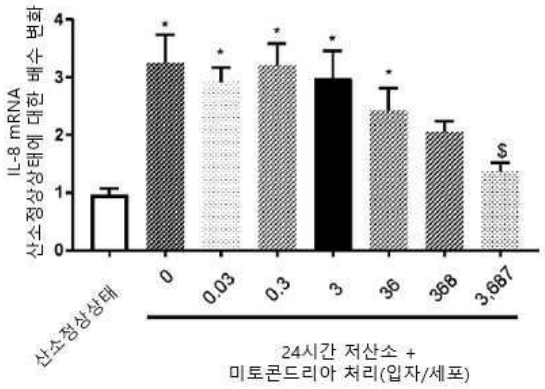
도면19



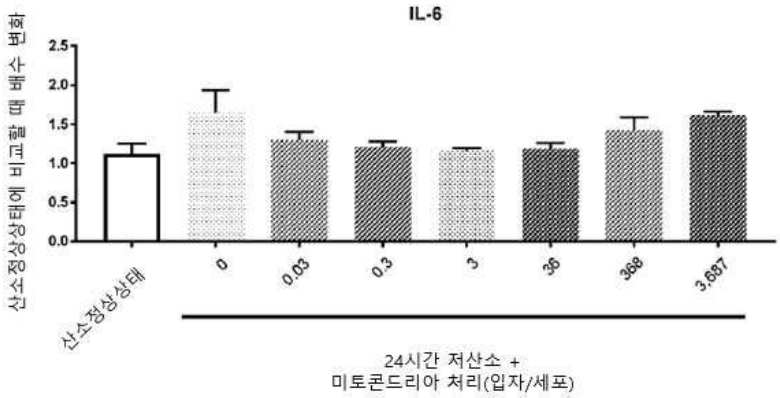
도면20



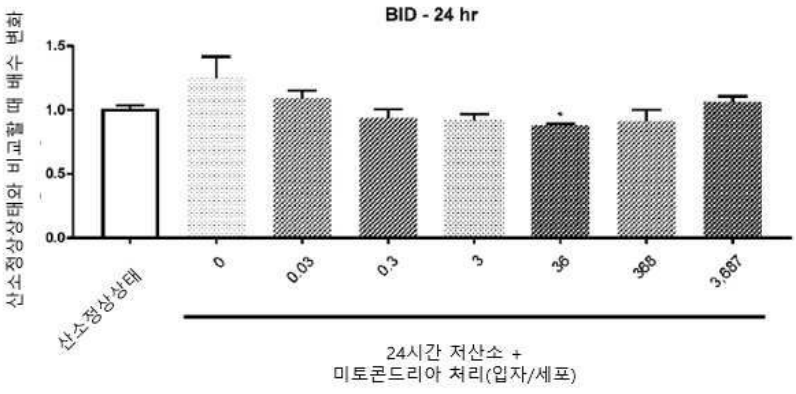
도면21a



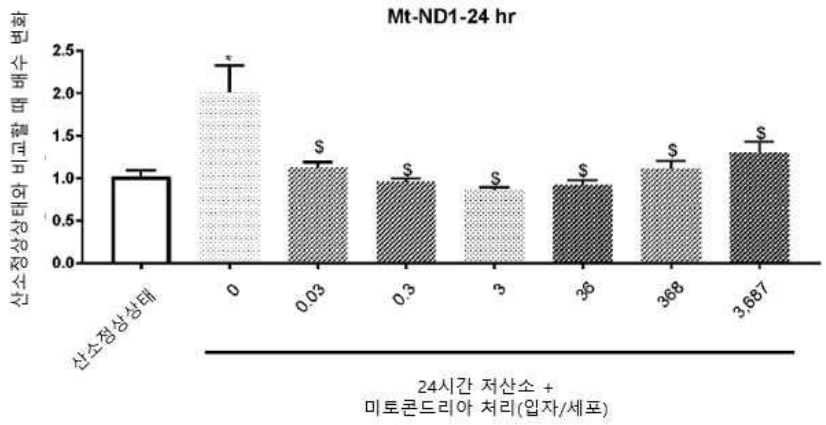
도면21b



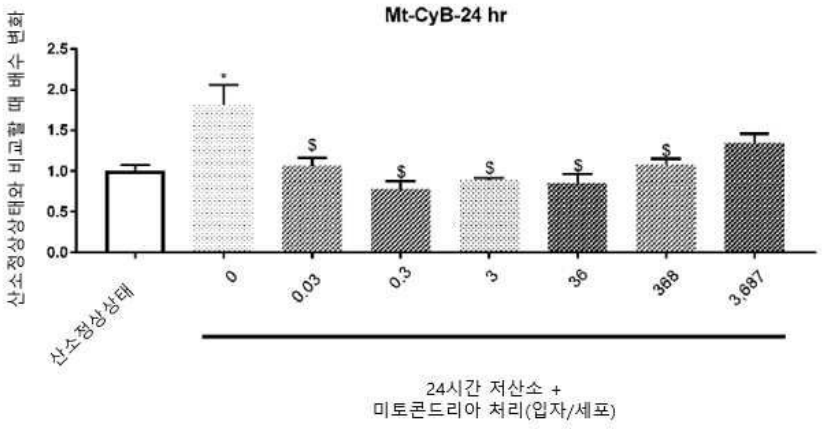
도면21c



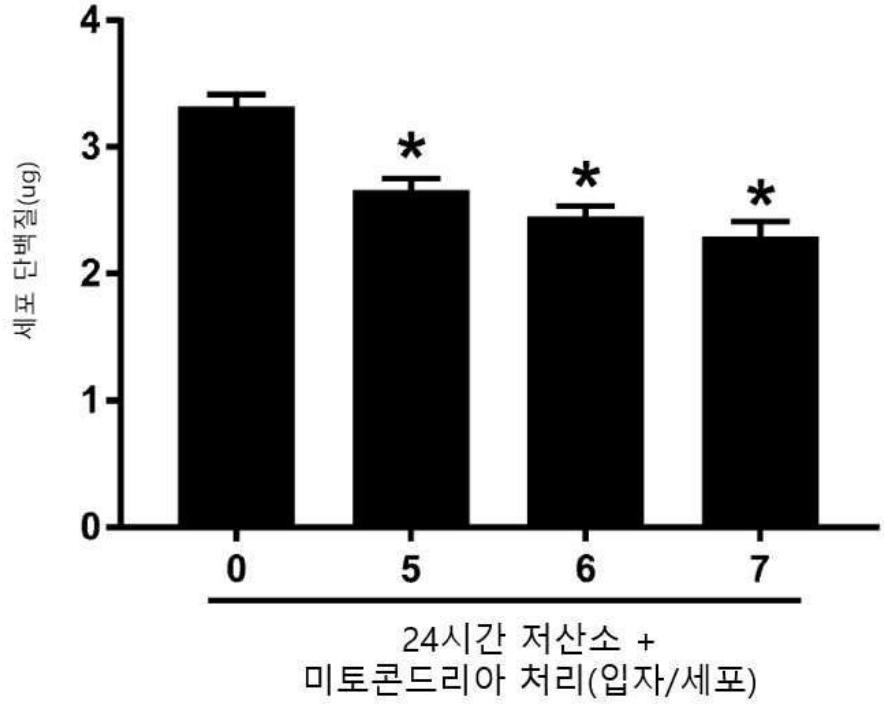
도면21d


Mt-ND1-24 hr
산소정상상태와 비교할 때 배수 변화
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
$
산소정상상태
0
0.03
0.3
3
36
368
3,687
24시간 저산소 +
미토콘드리아 처리(입자/세포)

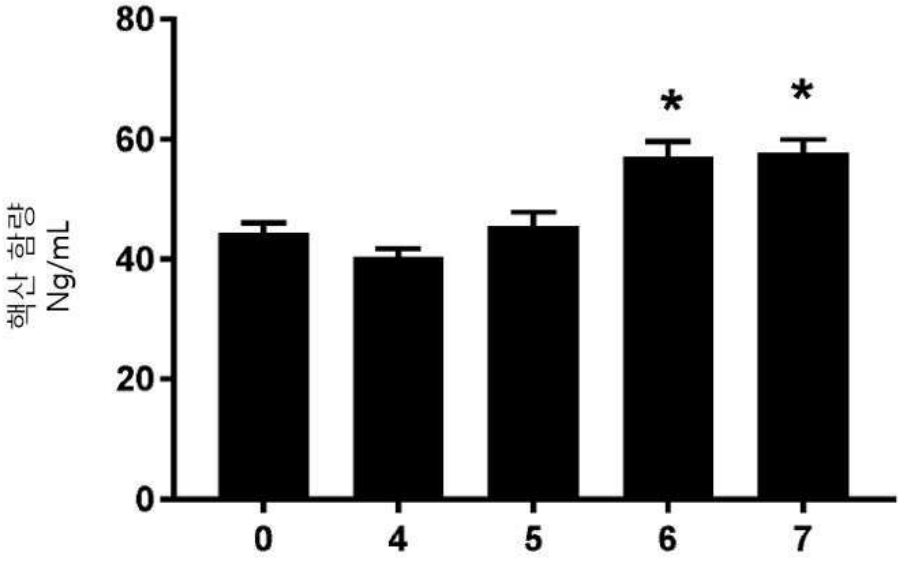
도면21e


Mt-CyB-24 hr
산소정상상태와 비교할 때 배수 변화
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
$
산소정상상태
0
0.03
0.3
3
36
368
3,687
24시간 저산소 +
미토콘드리아 처리(입자/세포)

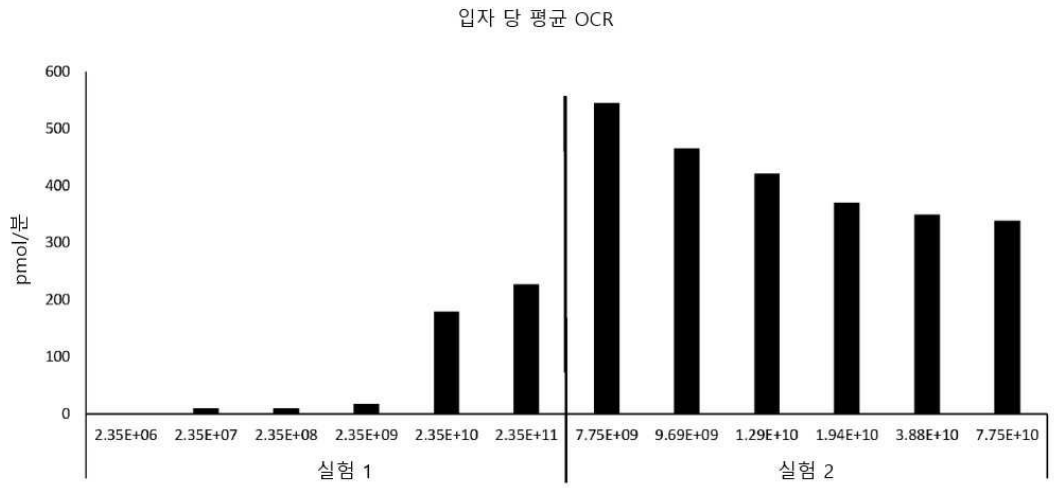
도면22


세포 단백질(ug)
4
3
2
1
0
*
*
*
0
5
6
7
24시간 저산소 +
미토콘드리아 처리(입자/세포)

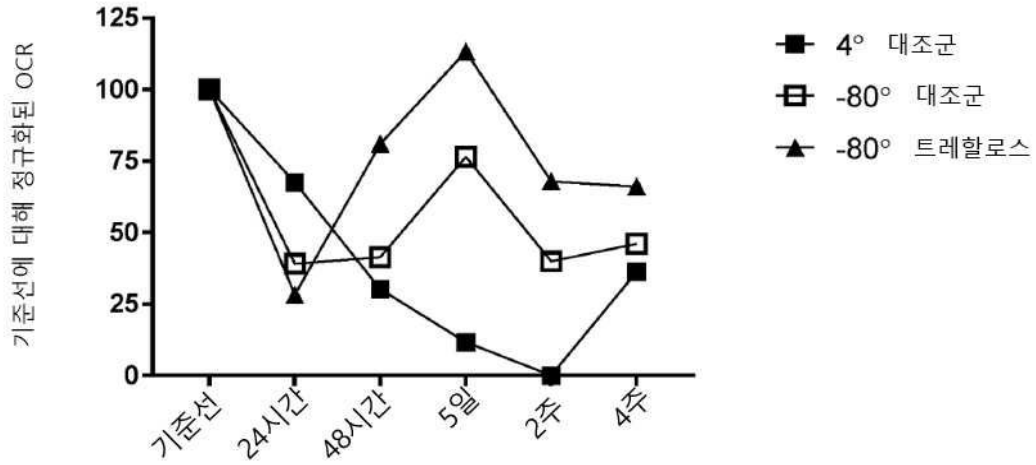
도면23


핵산 함량
Ng/mL
80
60
40
20
0
*
*
0
4
5
6
7

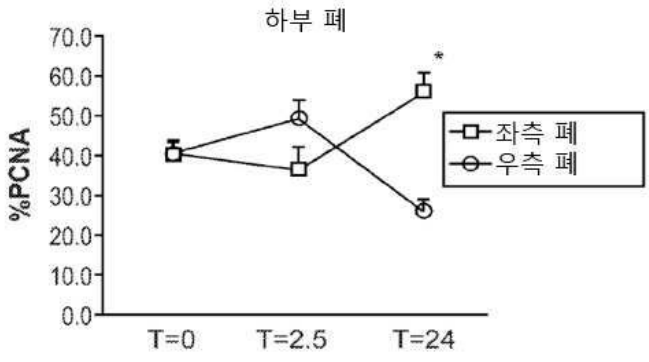
도면24



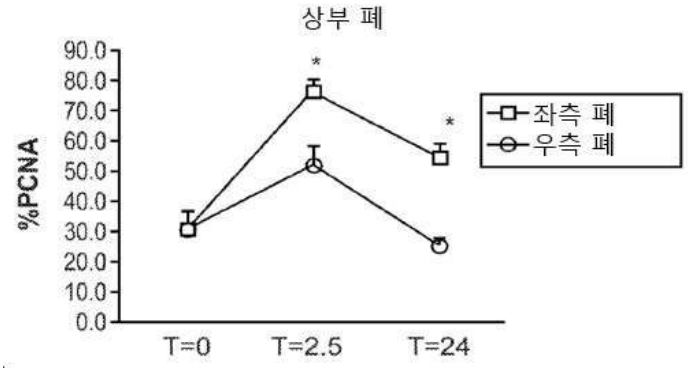
도면25



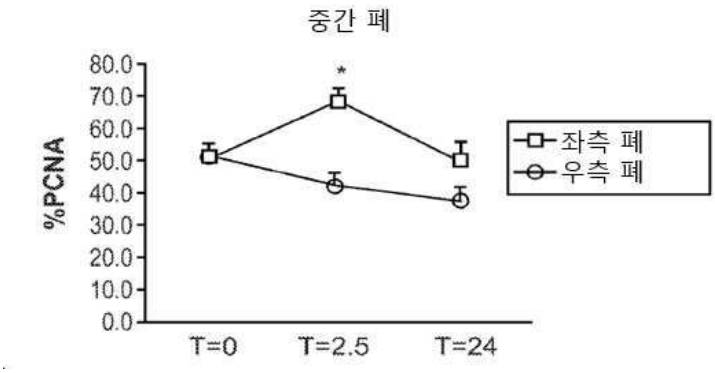
도면26a



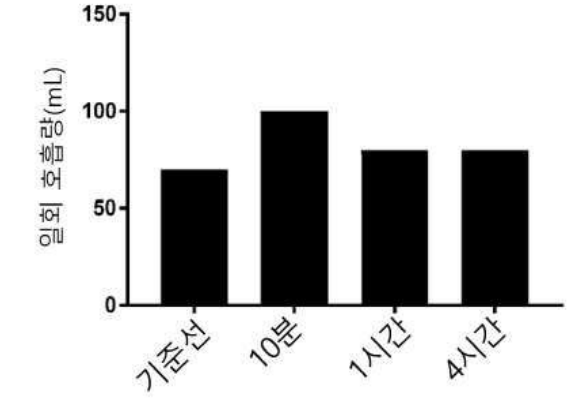
도면26b



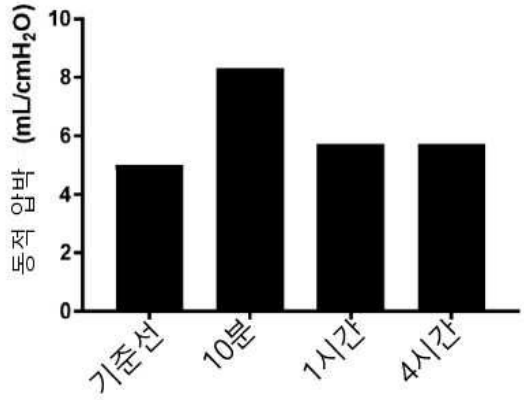
도면26c



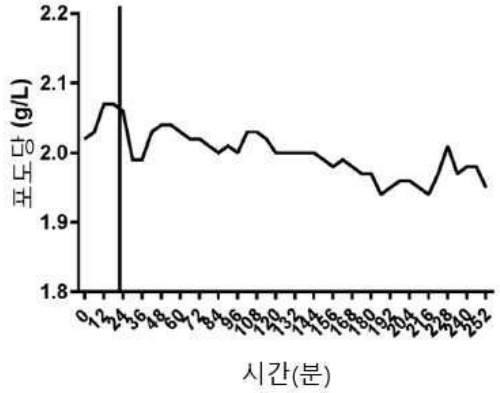
도면27a



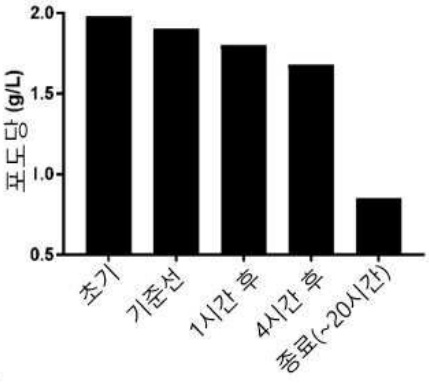
도면27b



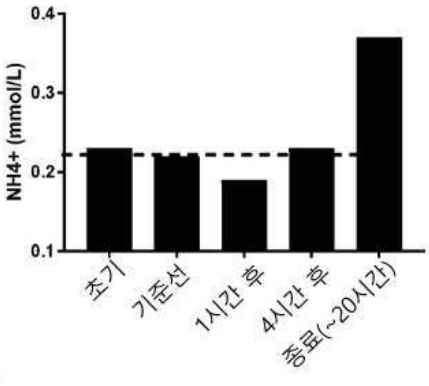
도면28a



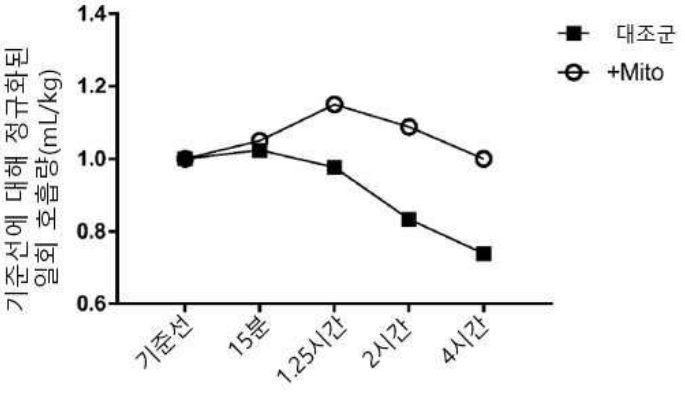
도면28b



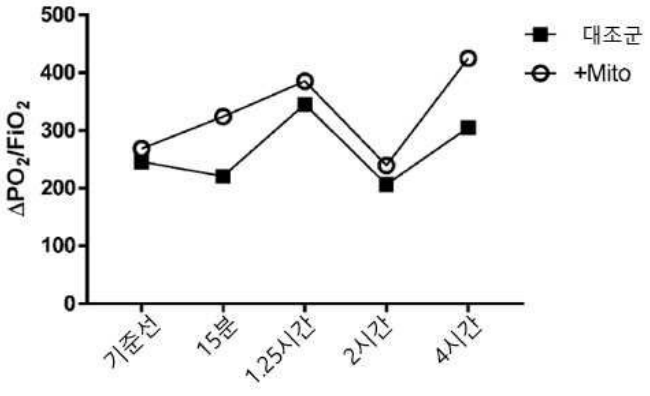
도면28c



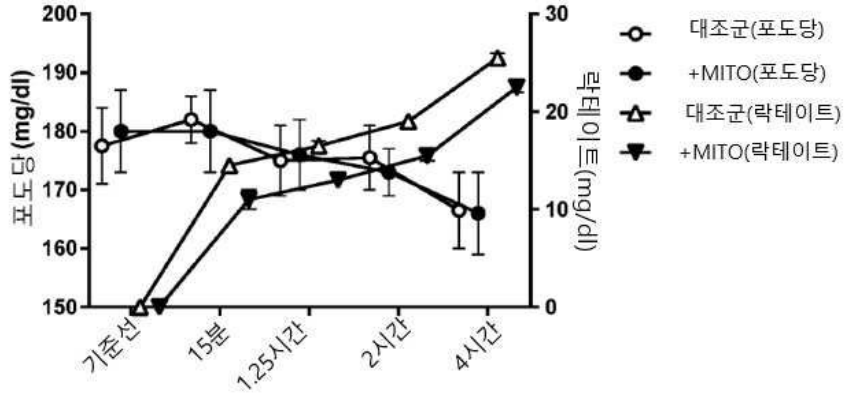
도면29a



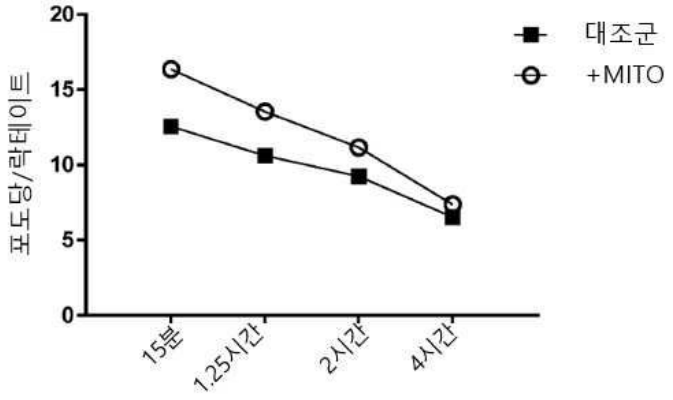
도면29b



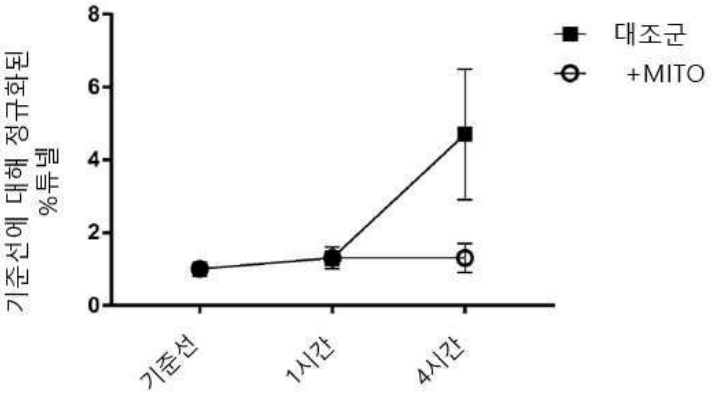
도면30a



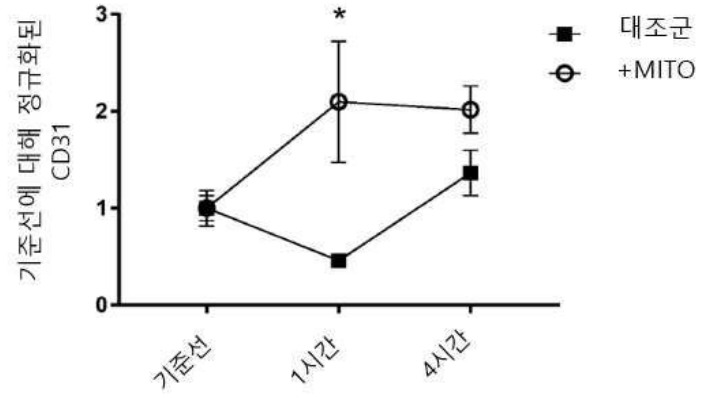
도면30b



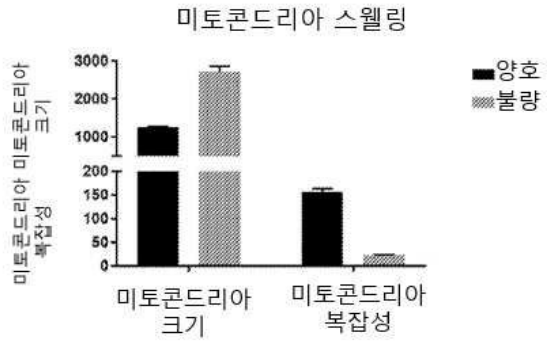
도면31a



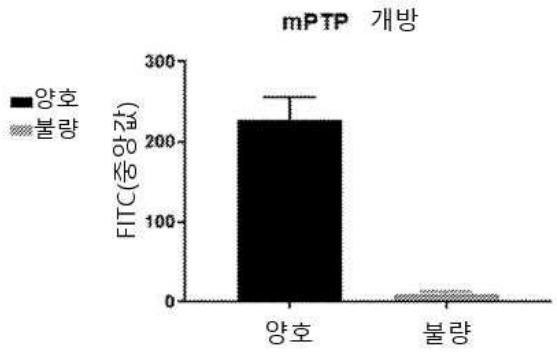
도면31b



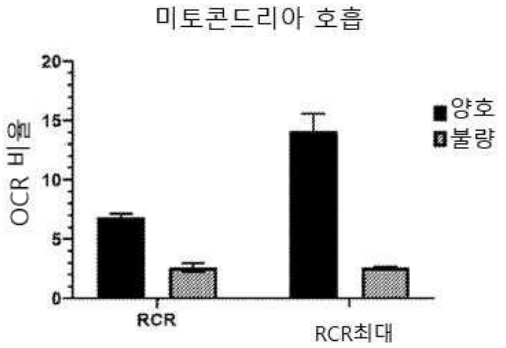
도면32a



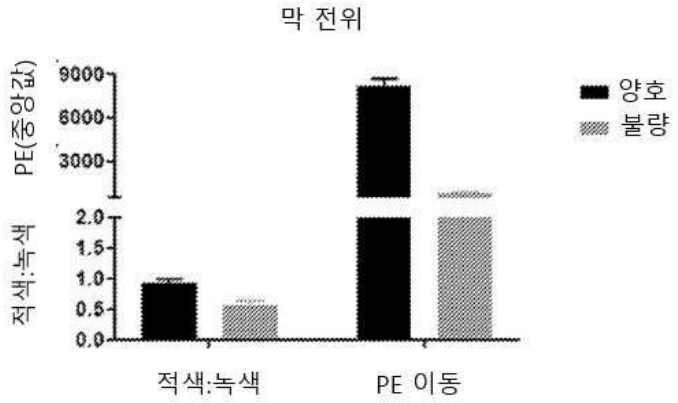
도면32b



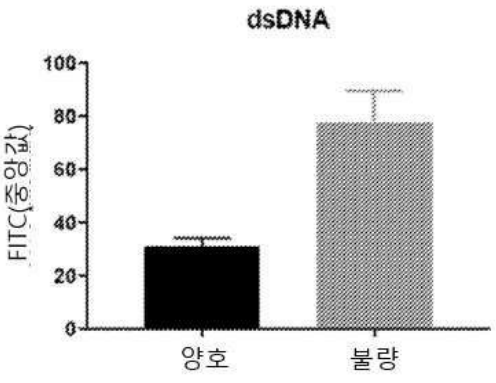
도면32c



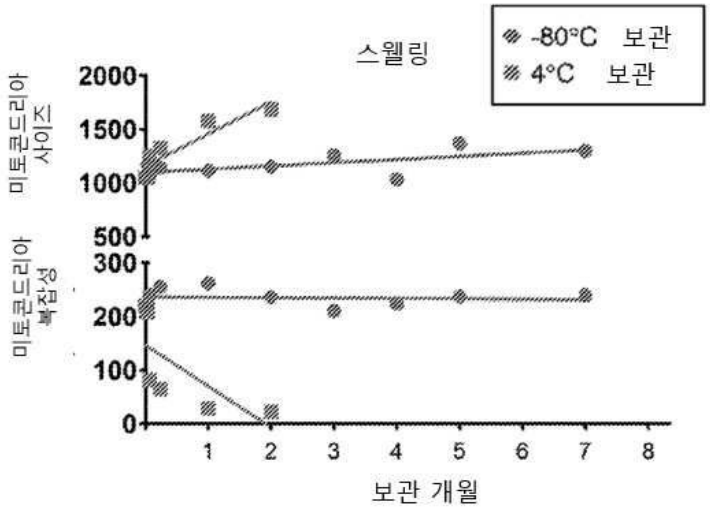
도면33a



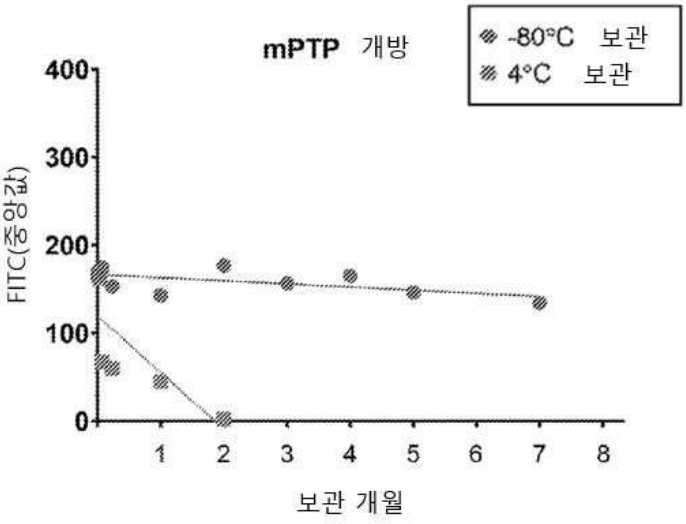
도면33b



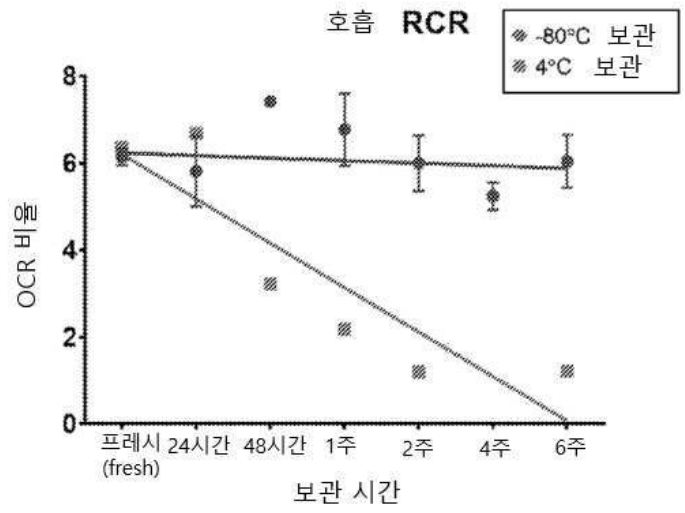
도면34a


스웰링
-80°C 보관
4°C 보관
미토콘드리아 사이즈
2000
1500
1000
500
미토콘드리아 복잡성
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
보관 개월

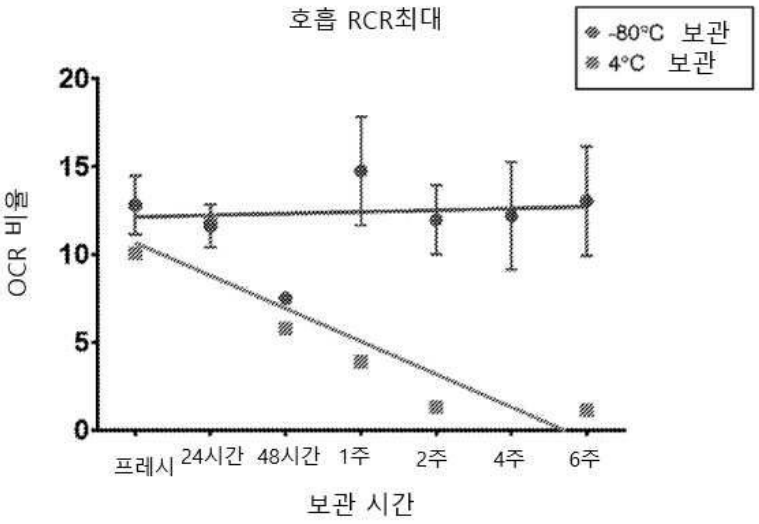
도면34b


mPTP 개방
-80°C 보관
4°C 보관
FITC(중앙값)
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
보관 개월

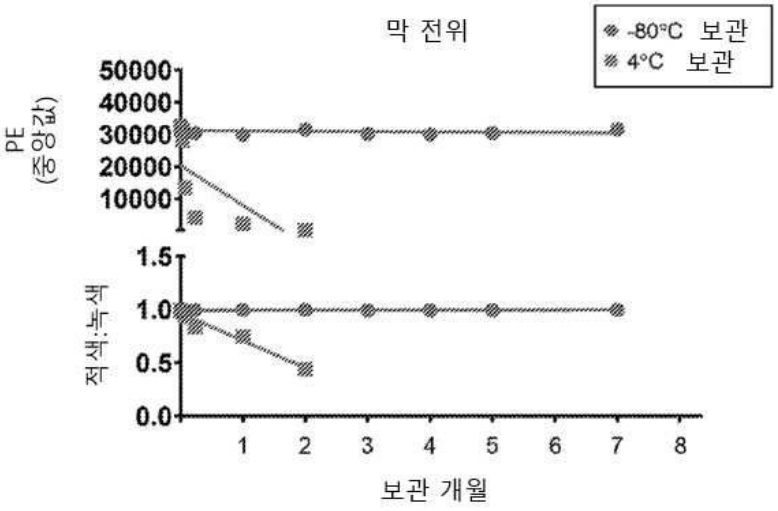
도면34c


호흡 RCR
-80°C 보관
4°C 보관
OCR 비율
8
6
4
2
0
프레시 (fresh)
24시간
48시간
1주
2주
4주
6주
보관 시간

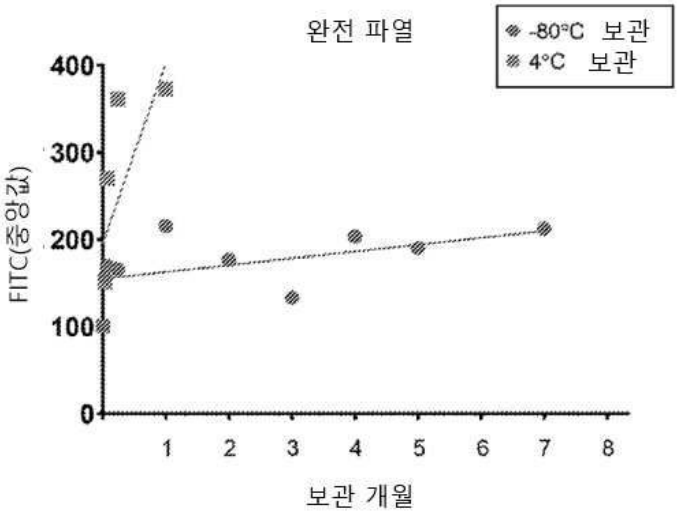
도면34d


호흡 RCR최대
-80°C 보관
4°C 보관
OCR 비율
20
15
10
5
0
프레시
24시간
48시간
1주
2주
4주
6주
보관 시간

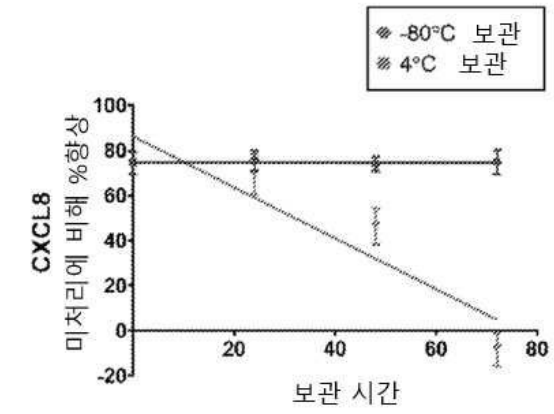
도면35a



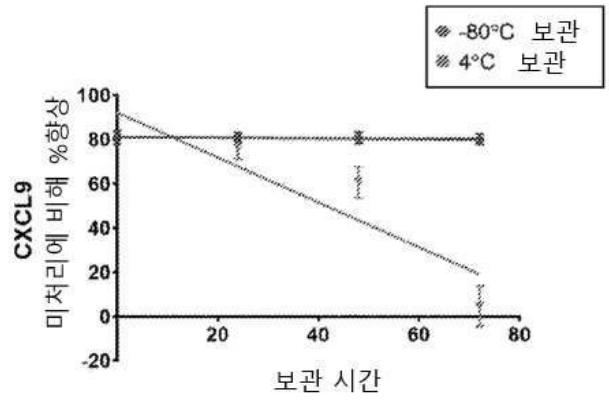
도면35b



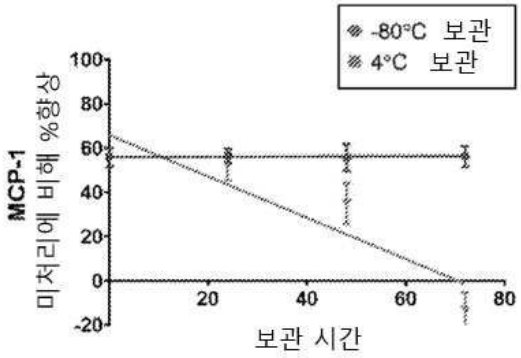
도면36a



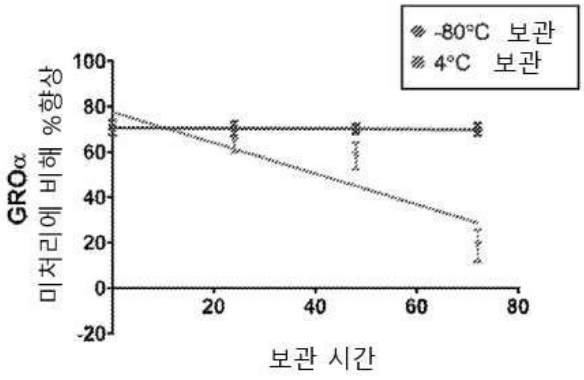
도면36b



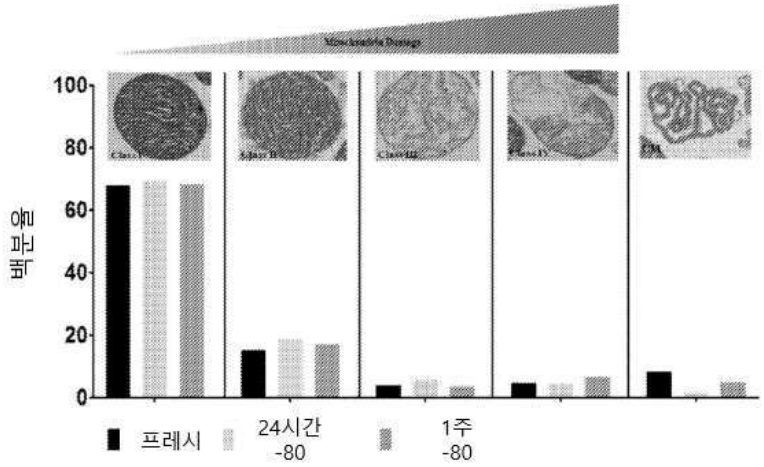
도면36c



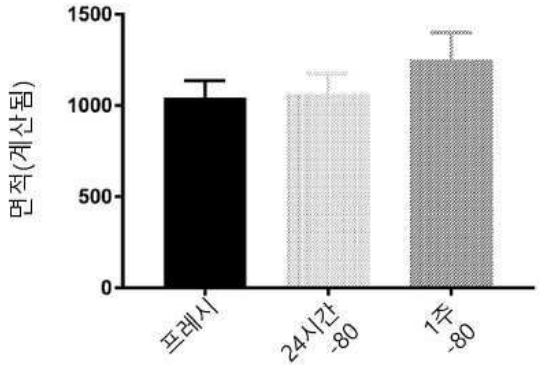
도면36d



도면37a

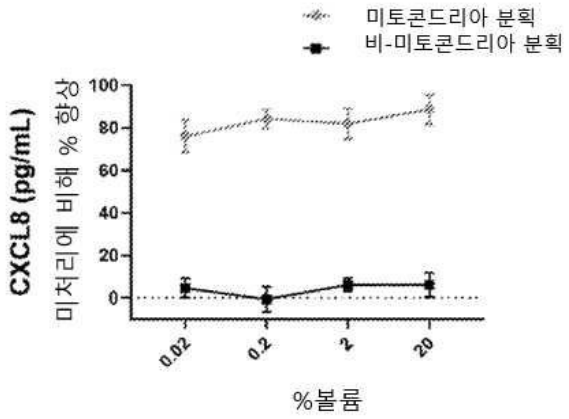


도면37b

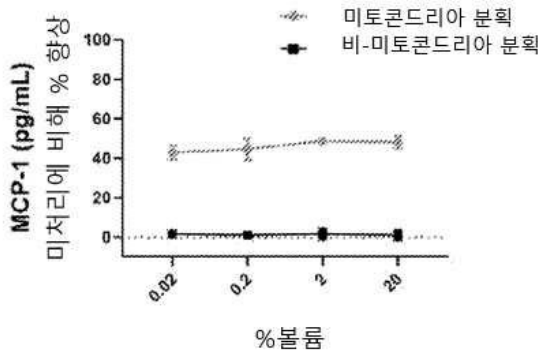


유의미한 차이 없음

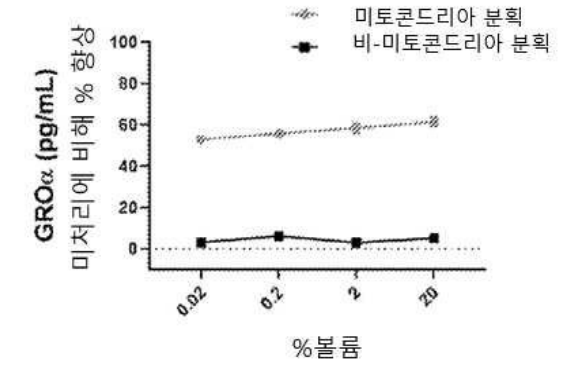
도면38a



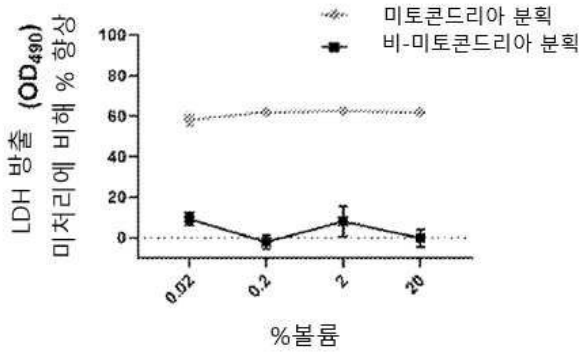
도면38b



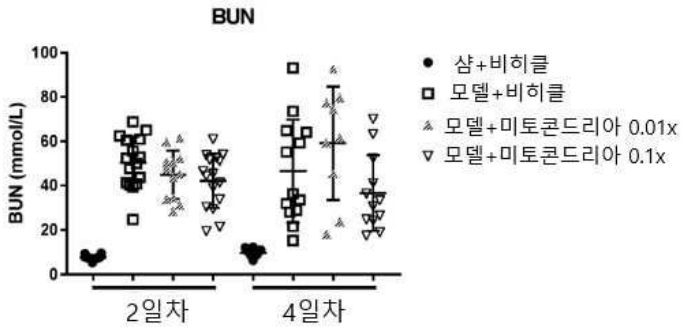
도면38c



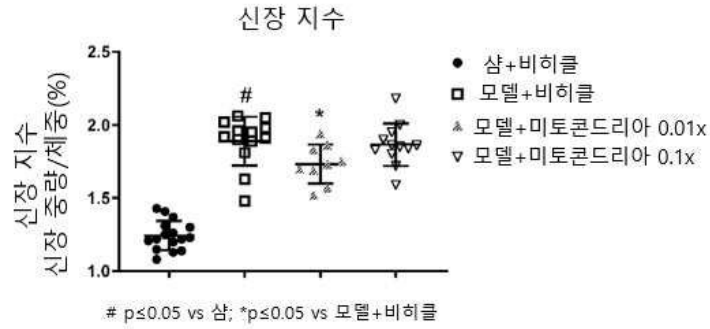
도면38d



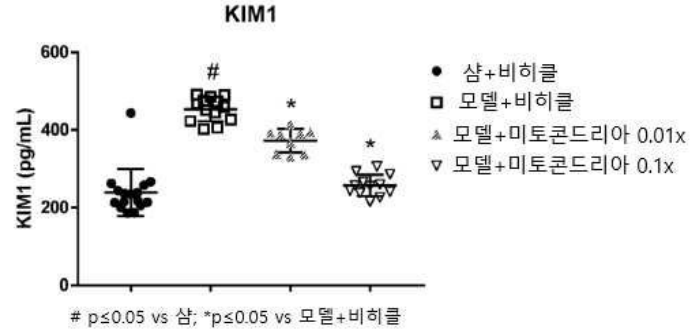
도면39a



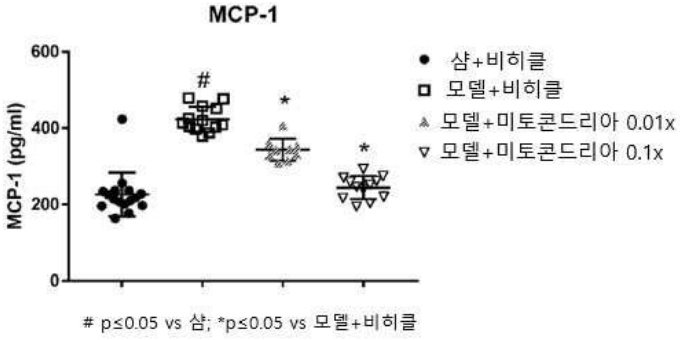
도면39b



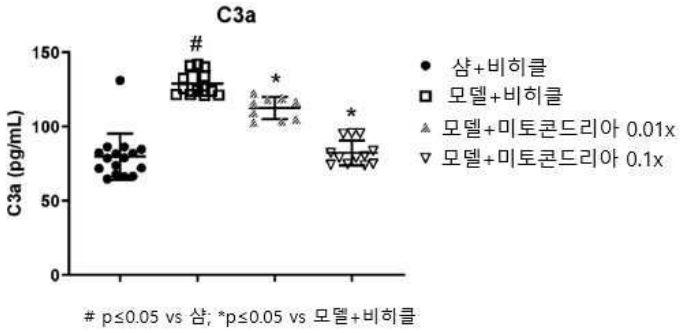
도면39c



도면39d

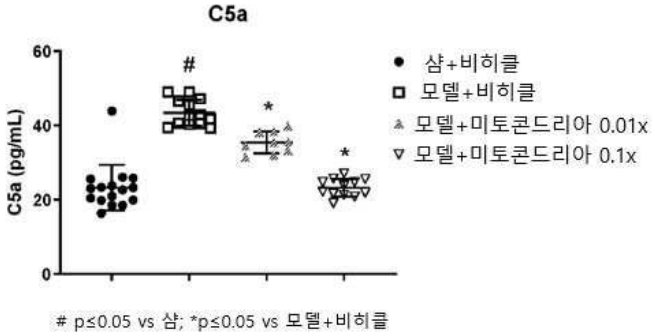


도면39e



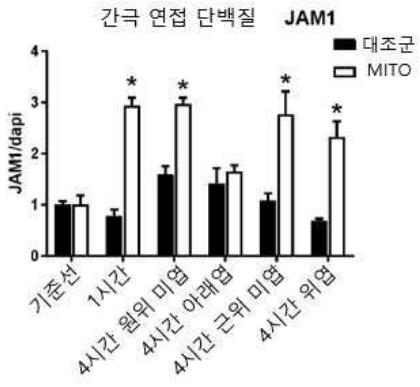
p≤0.05 vs 샴; *p≤0.05 vs 모델+비히클

도면39f

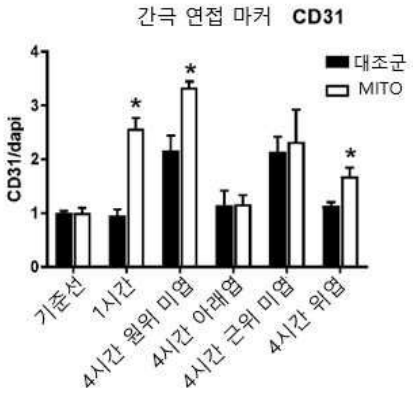


p≤0.05 vs 샴; *p≤0.05 vs 모델+비히클

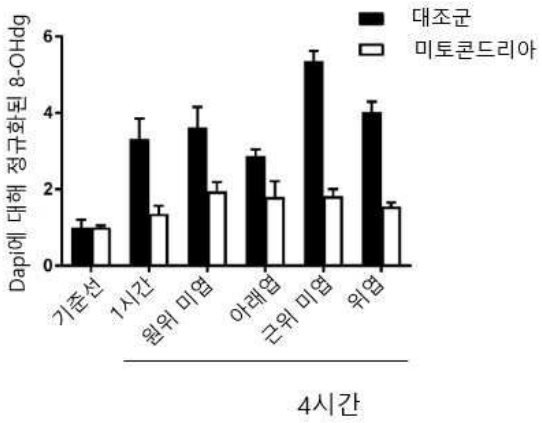
도면40a



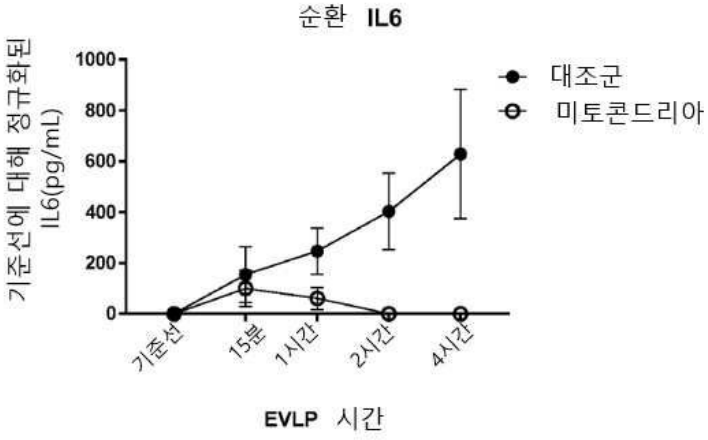
도면40b



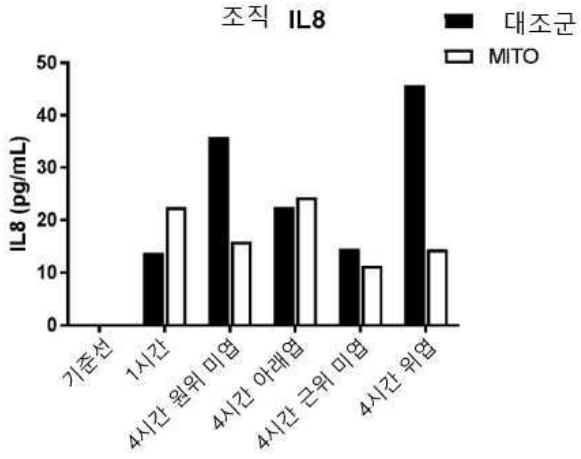
도면40c



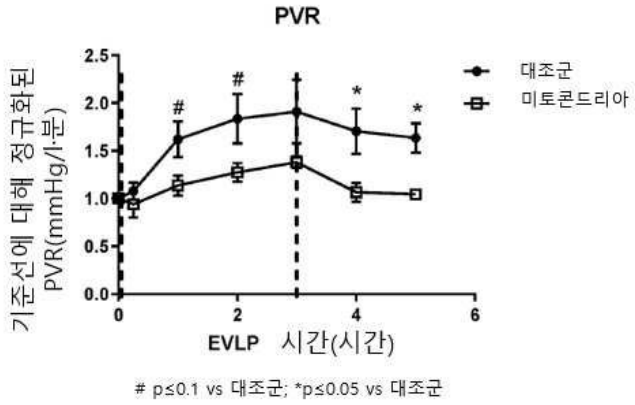
도면41a



도면41b

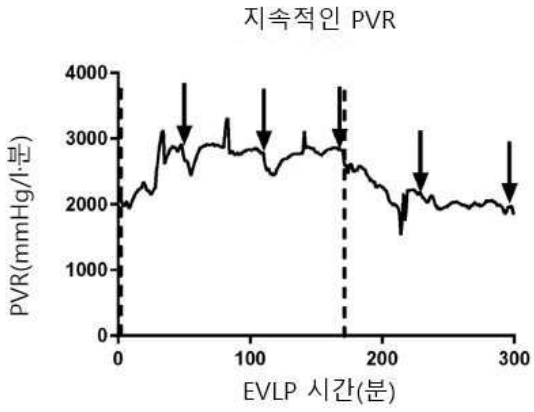


도면42a

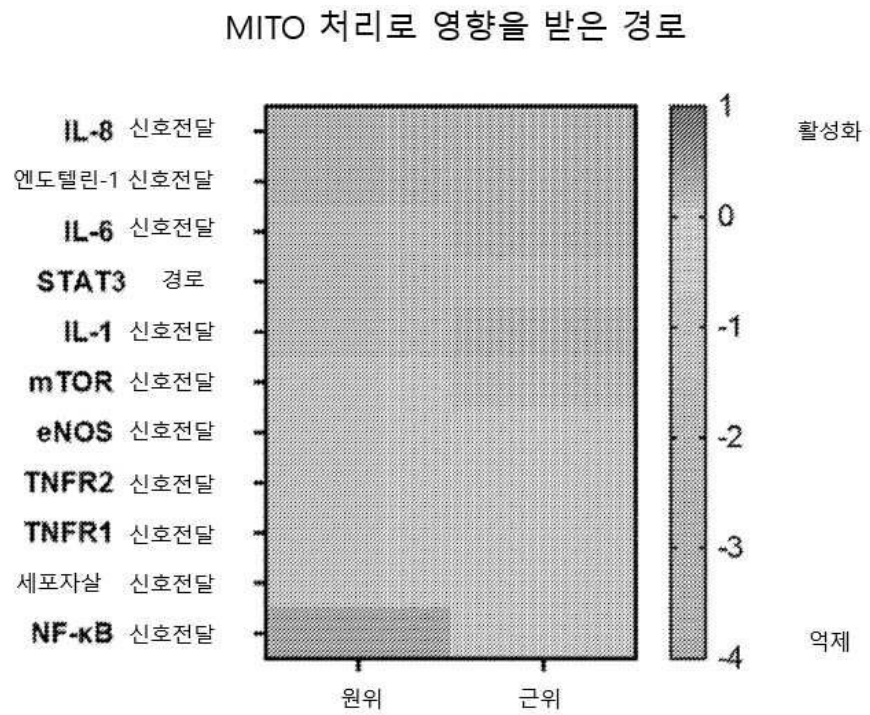


p≤0.1 vs 대조군; *p≤0.05 vs 대조군

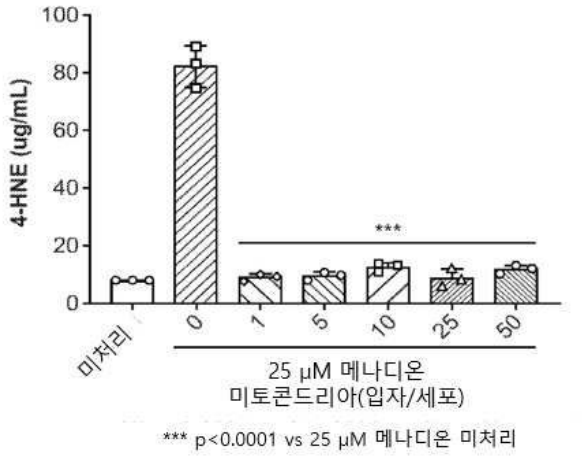
도면42b



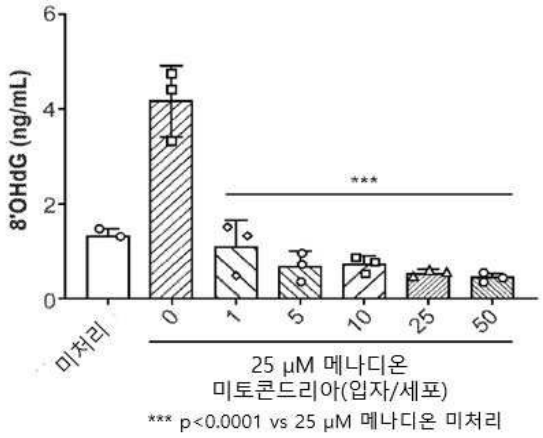
도면43


MITO 처리로 영향을 받은 경로
IL-8 신호전달
엔도텔린-1 신호전달
IL-6 신호전달
STAT3 경로
IL-1 신호전달
mTOR 신호전달
eNOS 신호전달
TNFR2 신호전달
TNFR1 신호전달
세포자살 신호전달
NF-κB 신호전달
1
0
-1
-2
-3
-4
활성화
억제
원위
근위

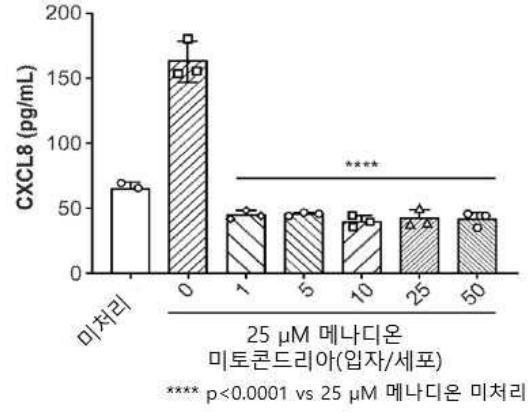
도면44a


4-HNE (ug/mL)
100
80
60
40
20
0
***
미처리
0
1
5
10
25
50
25 μM 메나디온
미토콘드리아(입자/세포)
*** p<0.0001 vs 25 μM 메나디온 미처리

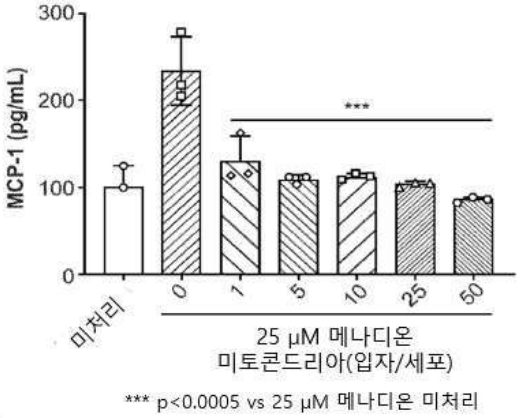
도면44b



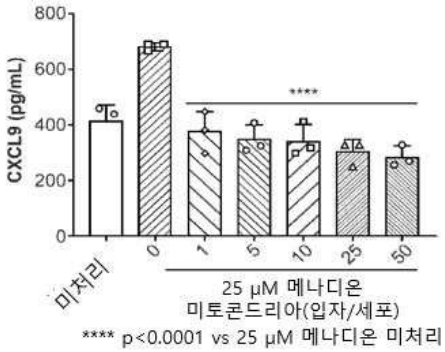
도면44c



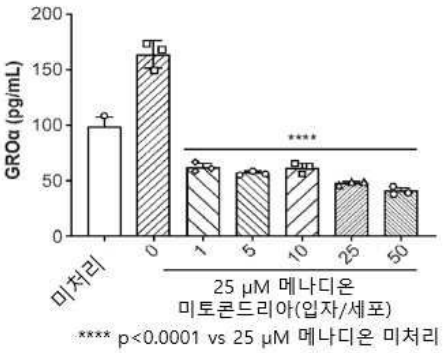
도면44d



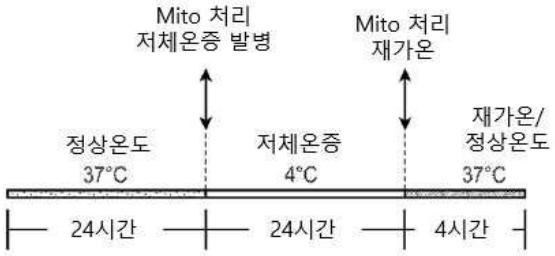
도면44e



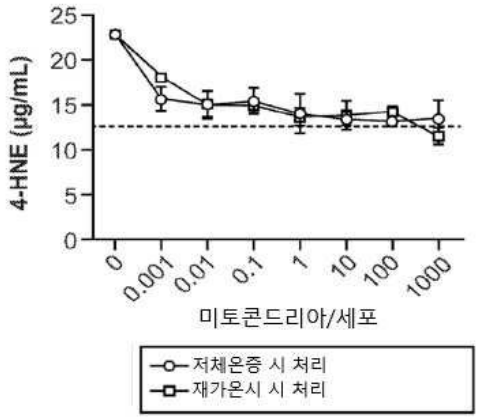
도면44f



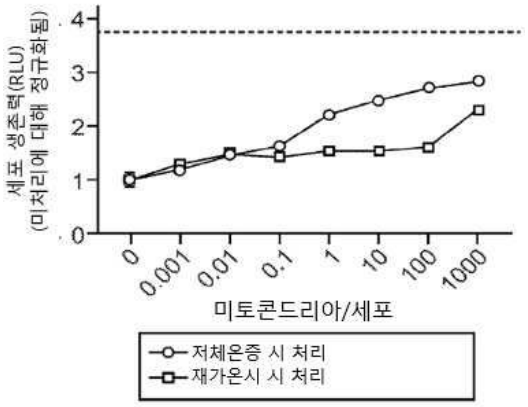
도면45a



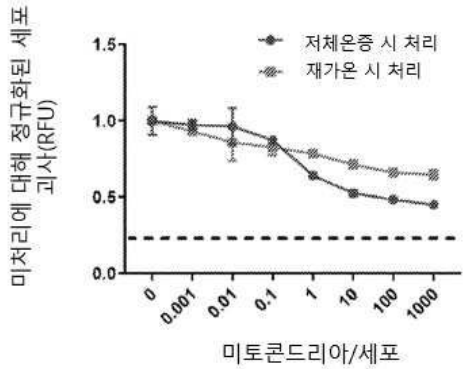
도면45b



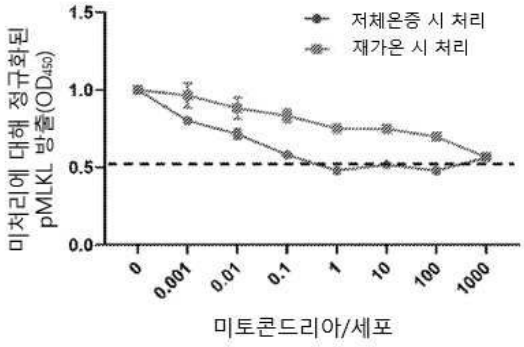
도면45c



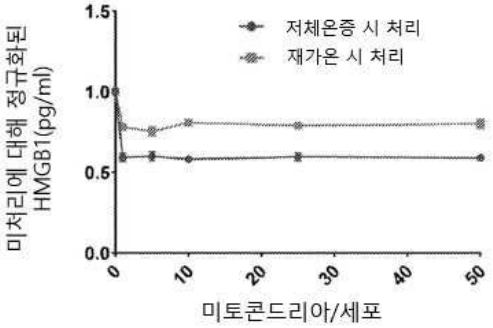
도면46a



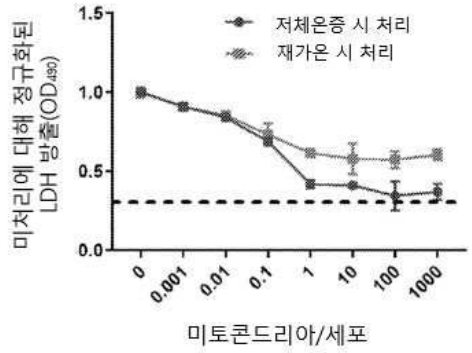
도면46b



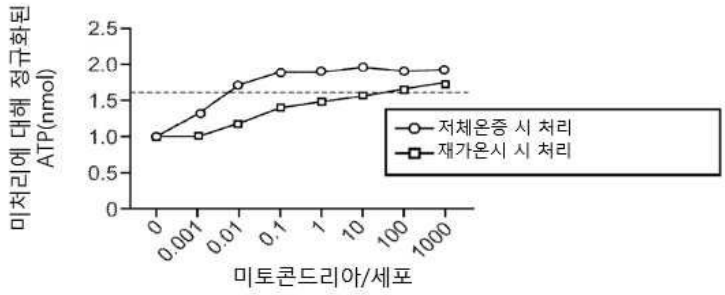
도면46c



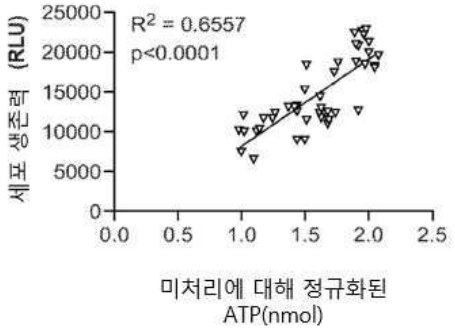
도면46d



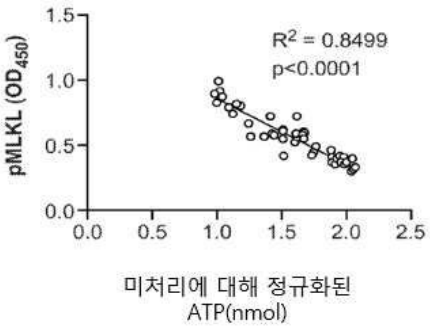
도면47a



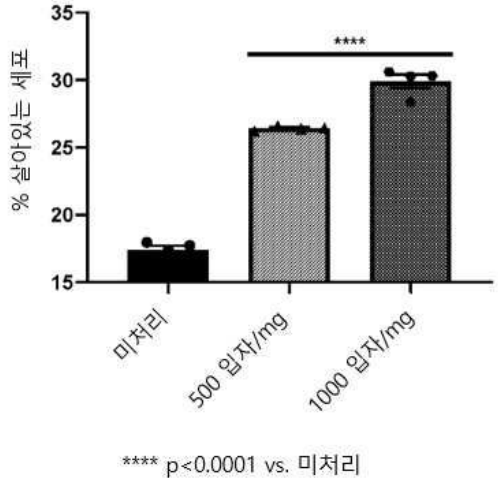
도면47b



도면47c

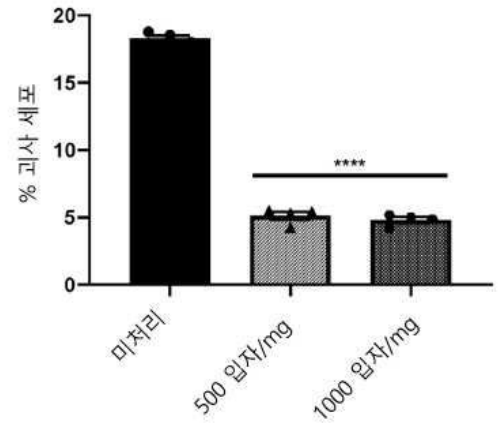


도면48a



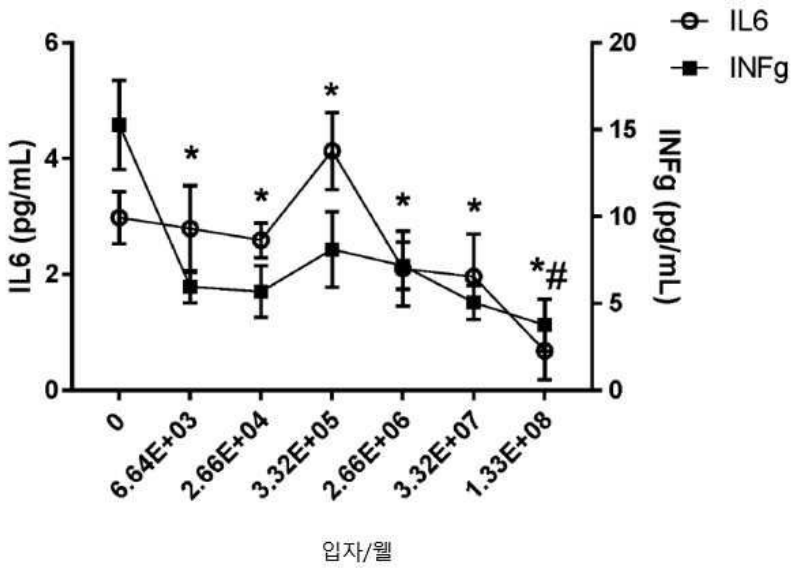
**** p<0.0001 vs. 미처리

도면48b



**** p<0.0001 vs. 미처리

도면49



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> UNITED THERAPEUTICS CORPORATION

<120> MITOCHONDRIAL TREATMENT OF ORGANS FOR TRANSPLANTATION

<130> 080618-1944

<140> PCT/US2020/038133

<141> 2020-06-17

<150> 62/863,034

<151> 2019-06-18

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
6xHis tag"

<400> 1

His His His His His His

1 5

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 2

cagcactatg tgcaatcaca caaaa 25

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 3

tggttgatgc cgattgtcac tatt 24

<210> 4

<211> 19

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 4

tcgtagcctt ctcaacttc 19