

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490126 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.06.03

(51) Int. Cl. A61K 35/12 (2015.01)  
A61K 38/17 (2006.01)  
A61P 37/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.09.01

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ

(31) 63/240,637

(32) 2021.09.03

(33) US

(86) PCT/US2022/075809

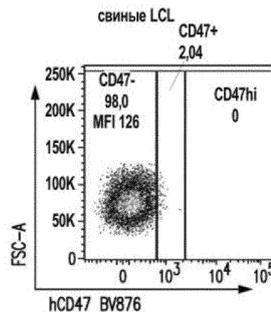
(87) WO 2023/034894 2023.03.09

(71) Заявитель:  
ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ КОЛАМБИЯ  
ЮНИВЕРСИТИ ИН ДЗЕ СИТИ ОФ  
НЬЮ ЙОРК (US)

(72) Изобретатель:  
Сайкс Меган, Ян Юн-Гуан (US)

(74) Представитель:  
Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предлагаются способы ксенотрансплантации, например трансплантация от свиньи человеку. В настоящем изобретении также предлагаются внеклеточные везикулы ("EV", например, экзосомы) и композиции, содержащие их, например EV, экспрессирующие человеческий CD47. Также в данном документе представлены способы получения EV и их применения для ксенотрансплантации. В некоторых аспектах способы ксенотрансплантации включают этапы экспрессии человеческого CD47 на ксенотрансплантатах.



A1

202490126

202490126

A1

## СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ

### 1. Перекрестные ссылки

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/240 637, поданной 03 сентября 2021 г., полное содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

### 2. Перечень последовательностей

[0002] Данная заявка содержит машиночитаемый перечень последовательностей, который был представлен в формате файла XML через Патентный центр, полное содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. XML-файл Перечня последовательностей, представленный через Патентный центр, под названием «14648-004-228\_seqlist.xml», был создан 30 августа 2022 г. и имеет размер 32 782 байта.

### 3. Права государственной лицензии

[0003] Это изобретение было создано при государственной поддержке в рамках гранта № P01 AI045897, выданного Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) и Национальными институтами здравоохранения (NIH). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

### 4. Введение

[0004] В настоящем изобретении предлагаются способы ксенотрансплантации, например, трансплантация от свиньи человеку. В настоящем изобретении также предлагаются внеклеточные везикулы («EV», *например*, экзосомы) и композиции, содержащие их, *например*, EV, экспрессирующие человеческий CD47. Также в данном документе представлены способы получения EV и их применения для ксенотрансплантации. В некоторых аспектах способы ксенотрансплантации включают этапы экспрессии человеческого CD47 на ксенотрансплантатах. В определенных аспектах указанный способ ксенотрансплантации не зависит от экспрессии сигнального регуляторного белка  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) на ткани-мишени.

### 5. Уровень техники

[0005] Острая нехватка аллогенных доноров в настоящее время ограничивает количество выполняемых трансплантаций органов. Этот дисбаланс потребности и предложения может быть устранен за счет использования органов других видов (ксенотрансплантатов). Учитывая этические проблемы и непрактичность использования нечеловеческих приматов, свиньи считаются наиболее подходящим видом доноров для человека. Помимо размера органов и физиологического сходства с людьми, способность свиней к быстрому размножению и скрещиванию близкородственных организмов делает

их особенно восприимчивыми к генетическим модификациям, которые могут улучшить их способность функционировать в качестве доноров трансплантатов для человека (Sachs 1994, *Path. Biol.* 42:217-219; Piedrahita *et al.*, 2004, *Am. J. Transplant*, 4 Suppl. 6:43-50).

**[0006]** Хотя трансплантация в сочетании с неспецифической иммуносупрессивной терапией ассоциируется с высокой ранней переносимостью трансплантата, основным ограничением успеха клинической трансплантации органов является поздняя потеря трансплантата, в значительной степени обусловленная хроническим отторжением трансплантата. Пересадка почки сохраняет в среднем 4,4 года жизни каждого реципиента. См. Rana *et al.* *JAMA Surg.* 2015;150(3):252-259. Однако более 30% трансплантатов отказывают в течение 10 лет после пересадки живой донорской почки. См. Department of Health and Human Services: 2017 Annual Data Report: Kidney [retrieved on March 22, 2021]. Получено из Интернета: < URL: [srtr.transplant.hrsa.gov/annual\\_reports/2017/Kidney.aspx](http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/2017/Kidney.aspx)>.

**[0007]** Иммунная толерантность более важна для успешной клинической ксенотрансплантации, поскольку уровень пожизненной иммуносупрессии, необходимый для предотвращения отторжения ксенотрансплантата, может быть слишком токсичным, чтобы быть приемлемым. Кроме того, не выявлено маркеров, которые бы достоверно указывали на достижение иммунологической толерантности у пациентов, что приводит к отсутствию лабораторных показателей, на основании которых можно было бы отменить иммуносупрессию.

**[0008]** Поэтому задачи ксенотрансплантации включают оптимизацию долговечности смешанных химерных клеток, полученных от животного-донора, после их трансплантации ксеногенному реципиенту, а также поддержание здоровья и жизнеспособности животного-донора.

**[0009]** Смешанный химеризм может индуцировать толерантность к донору на уровне Т-клеток, В-клеток и естественных клеток-киллеров (NK) у реципиента. Griesemer A, Yamada K. and Sykes M., 2014, *Immunol. Rev.* 258: 241-258. Sachs D. H., Kawai T. and Sykes M., 2014, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4:a015529. Гематопоз представляет собой жестко регулируемый процесс, включающий взаимодействие цитокинов и молекул адгезии в микроокружении костного мозга с рецепторами гемопоэтических клеток. Поскольку многие из этих лиганд-рецепторных взаимодействий являются видоспецифичными (*например*, IL-3 и IL-3R) или видоизбирательными (*например*, SCF-cKIT, GM-CSF-GM-CSFR, VLA-5-фибронектин), смешанные химерные клетки (*например*, от свиньи) будут находиться в невыгодном конкурентном положении по сравнению с эндогенными кроветворными клетками (*например*, клетками человека), что приведет к постепенной

гибели трансплантированных клеток. Поскольку стойкий смешанный химеризм может наилучшим образом обеспечить толерантность к Т-, В- и NK-клеткам на протяжении всей жизни, такая потеря химеризма нежелательна.

**[0010]** Введение человеческих цитокиновых рецепторов и молекул адгезии животному-донору свинье помогло бы преодолеть этот конкурентный недостаток, гарантируя пожизненный химеризм и толерантность. Griesemer A, Yamada K. and Sykes M., 2014, *Immunol. Rev.*, 258: 241-258. Поскольку гемопоэз жестко регулируется, может оказаться желательным вставить эти гены в их естественный локус в геноме свиньи, чтобы они могли функционировать физиологическим образом под контролем нативной регуляторной последовательности. Этого можно добиться, разрушив родной свиной ген и заменив его человеческим аналогом. Однако при таком подходе может возникнуть проблема, связанная с тем, что свиные клетки окажутся невосприимчивыми или гиповосприимчивыми к видоспецифичным или видоизбирательным свиным цитокинам (или лигандам адгезии), соответственно. Поэтому длительная экспрессия человеческих трансгенов может пагубно сказаться на здоровье животного-донора. Dwyer *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2004 May; 113(10):1440-6, и Crikis *et al.*, 2010, *Am. J. Transplant*; 10:242-50.

**[0011]** CD47, также известный как интегрин-ассоциированный белок (IAP), представляет собой повсеместно экспрессируемый 50-кДа гликопротеин клеточной поверхности и служит лигандом для сигнального регуляторного белка (SIRP) $\alpha$  (также известного как CD172a и SHPS-1) (Brown, 2002, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14:603-7; Brown and Frazier, 2001, *Trends Cell Biol.*, 11:130-5). CD47 и SIRP $\alpha$  образуют систему связи между клетками, которая играет важную роль в различных клеточных процессах, включая миграцию клеток, адгезию В-клеток и активацию Т-клеток (Liu *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277: 10028; Motegi *et al.*, 2003, *EMBO* 122:2634; Yoshida *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 168:3213; Latour *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 167:2547). Кроме того, система CD47-SIRP $\alpha$  участвует в негативной регуляции фагоцитоза макрофагами. CD47 на поверхности некоторых типов клеток (*например*, эритроцитов, тромбоцитов или лейкоцитов) подавляет фагоцитоз макрофагами. Роль взаимодействия CD47-SIRP $\alpha$  в ингибировании фагоцитоза была проиллюстрирована наблюдением, что первичные мышинные макрофаги дикого типа быстро фагоцитируют неопсонизированные эритроциты (RBC), полученные от CD47-дефицитных мышей, но не от мышей дикого типа (Oldenborg *et al.*, 2000; *Science* 288:2051). Также сообщалось, что через свои рецепторы, SIRP $\alpha$ , CD47 ингибирует как Fc $\gamma$ , так и опосредованный рецепторами комплемента фагоцитоз (Oldenborg *et al.*, *J.* 2001; *Exp. Med.* 193:855).

**[0012]** CD47 экспрессируется убиквитарно и выступает в качестве лиганда сигнального

регуляторного белка (SIRP) $\alpha$ , важнейшего ингибирующего рецептора на макрофагах и дендритных клетках (DC). Появляющиеся данные свидетельствуют о том, что сигнальный путь CD47-SIRP $\alpha$  играет важную роль в регуляции активации макрофагов и DC, предлагая перспективную мишень для вмешательства при иммунологических заболеваниях. Система клеточной коммуникации CD47-SIRP $\alpha$  является видоспецифичной (*например*, свиной CD47 не ингибирует фагоцитоз клеток костного мозга свиньи. Отсутствие перекрестной реакции между свиным CD47 и человеческим SIRP $\alpha$  также способствует отторжению других типов свиных клеток (*например*, гепатоцитов) человеческими макрофагами, стимулирует активацию DC (см. ниже) и, следовательно, вызывает антисвиной Т-клеточный ответ.

**[0013]** Клетки с дефицитом CD47 активно отторгаются макрофагами после введения сингенным мышам дикого типа (WT), демонстрируя, что CD47 подает макрофагам сигнал «не ешь меня» (Oldenberg PA, *et al.*, 2000 Science, 288:2051-4; Wang *et al.*, 2007, Proc Natl Acad Sci USA. 104:13744). Ксенотрансплантация с использованием свиней в качестве источника трансплантата может решить проблему острой нехватки человеческих донорских органов, которая является основным ограничивающим фактором в клинической трансплантации (Yang *et al.*, 2007, Nature reviews Immunology. 7:519-31). Сильное отторжение ксеногенных клеток макрофагами (Abe 2002, The Journal of Immunology 168:621) во многом обусловлено отсутствием функционального взаимодействия между донорским CD47 и реципиентным SIRP $\alpha$  (Wang *et al.*, 2007, Blood; 109:836-42, Ide *et al.*, 2007, Proc Natl Acad Sci USA 104:5062-6. Navarro-Alvarez 2014, Cell transplantation, 23:345-54), что привело к созданию человеческих CD47 трансгенных свиней (Tena *et al.*, 2017, Transplantation 101:316-21; Nomura *et al.*, 2020, Xenotransplantation. 2020; 27:e12549). Помимо макрофагов, субпопуляция DC также экспрессирует SIRP $\alpha$  (Wang *et al.*, 2007, Proc Natl Acad Sci U S A. 104:13744-9, Guilliams *et al.*, 2016, Immunity. 45:669-84). Передача сигналов CD47-SIRP $\alpha$  также ингибирует активацию DC и их способность запускать Т-клетки и играет важную роль в индукции толерантности Т-клеток посредством донор-специфической трансфузии (DST) или трансплантации гепатоцитов (Wang *et al.*, 2007, Proc Natl Acad Sci U S A. 104:13744-9, Wang *et al.*, 2014, Cell transplantation 23:355-63. Zhang *et al.*, 2016, Sci Rep. 6:26839). Помимо того, что молекула «не ешь меня» ингибирует фагоцитоз посредством взаимодействия с SIRP $\alpha$ , при связывании с его лигандами (*например*, антителами анти-CD47, TSP-1, растворимым SIRP $\alpha$ ); передача сигналов CD47 также индуцирует старение клеток или гибель и подавляет пролиферацию клеток.

## **6. Краткое описание сущности изобретения**

**[0014]** В одном аспекте в данном документе предлагается способ ксенотрансплантации,

включающий (a) получение органа от свиньи-донора; (b) кросс-дрессинг органа с человеческим CD47; и (c) трансплантацию органа человеку-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения этап кросс-дрессинга включает в себя воздействие на орган человеческими внеклеточными везикулами (EV), содержащими CD47. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV выделяют из человеческих клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки экспрессируют рекомбинантный человеческий CD47. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки представляют собой трансгенные клетки.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг достигается путем инкубации органа с EV, экспрессирующими человеческий CD47, в течение 2 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг достигается путем инкубации органа с EV, экспрессирующими человеческий CD47, в течение 6 часов.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг достигается путем перфузии органа *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг достигается путем перфузии *in vivo* свиньи-донора, человека-реципиента или их комбинации.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза макрофагами человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 5% до около 25% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 25% до около 50% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 50% до около 75% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению

фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 75% до около 80% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 80% до около 85% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 85% до около 90% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 90% до около 95% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ не приводит к обнаружению фагоцитоза кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к повышению жизнеспособности органа за счет защиты от человеческих макрофагов, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессингированный орган избегает фагоцитоза без индукции апоптоза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессингированный орган избегает фагоцитоза и не демонстрирует какого-либо обнаруживаемого уровня апоптоза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют на от около 5% до около 25% более низкий уровень апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, полученные из кросс-



органом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на от около 85% до около 90% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на по меньшей мере 90% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на от около 5% до около 25% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на от около 25% до около 50% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на от около 50% до около 75% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на от около 75% до около 80% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на от около 80% до около 85% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на от около 85% до около 90% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у человека-реципиента наблюдается уменьшение системного воспаления после трансплантации на по меньшей мере 90% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган представляет собой почку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган представляет собой легкое. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человек-реципиент страдает почечной недостаточностью.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-

реципиенту требуется меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 10-20% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 20-30% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 30-40% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 40-50% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 50-60% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 60-70% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 70-80% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на 80-90% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения человеку-реципиенту требуется на по меньшей мере 90% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к снижению протеинурии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия снижается до менее 3 г за 24 часа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия снижается до 500 мг за 24 часа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия снижается до 300 мг за 24 часа. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия снижается до 150 мг за 24 часа.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия устраняется в течение двух недель после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия устраняется в течение одного месяца

после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия устраняется в течение двух месяцев после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения протеинурия устраняется в течение четырех месяцев после трансплантации.

**[0025]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ дополнительно включает трансплантацию ткани костного мозга реципиенту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения костный мозг берут от той же свиньи, что и почку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения костный мозг берут не от той свиньи, от которой берут почку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения костный мозг подвергается кросс-дрессингу человеческим CD47 путем воздействия EV.

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган не экспрессирует человеческого SIRP $\alpha$ .

## **7. Краткое описание графических материалов**

**[0027]** **ФИГ. 1А – ФИГ. 1С:** Кросс-дрессинг свиных LCL (ФИГ. 1А) трансгенным hCD47 (ФИГ. 1В) после совместного культивирования с hCD47-Tg клетками LCL (ФИГ. 1С).

**[0028]** **ФИГ. 2:** Кросс-дрессинг свиных LCL трансгенным hCD47 после совместного культивирования с hCD47-Tg клетками LCL.

**[0029]** **ФИГ. 3А и ФИГ. 3В:** Кросс-дрессинг человеческих клеток Jurkat (ФИГ. 3А) трансгенным hCD47 после совместного культивирования с hCD47-Tg клетками LCL (ФИГ. 3В).

**[0030]** **ФИГ. 4А – ФИГ. 4С:** Кросс-дрессинг клеток hCD47КО Jurkat (ФИГ. 4А) нативным hCD47 (ФИГ. 4В) после совместного культивирования с клетками WT Jurkat (ФИГ. 4С).

**[0031]** **ФИГ. 5А и ФИГ. 5В:** Кросс-дрессинг свиных LCL (ФИГ. 5А) нативным hCD47 после совместного культивирования с клетками WT Jurkat (ФИГ. 5В).

**[0032]** **ФИГ. 6:** Экспрессия CD47 на клетках WT Jurkat, свиных клетках LCL/CD47<sup>P/h</sup>, клетках CD47КО Jurkat, клетках CD47КО, смешанных с клетками WT Jurkat (смешанными на момент окрашивания), клетках CD47КО Jurkat, совместно культивированных (24 ч) с клетками WT Jurkat или свиными клетками hCD47-Tg LCL, свиными клетками LCL и клетками LCL, совместно культивированными (24 ч) с клетками WT Jurkat. Цифры на фигуре обозначают среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) окрашивания CD47 на гейтированных CD47КО клетках Jurkat и свиных клетках LCL.

**[0033]** **ФИГ. 7А - 7Д:** Измерение CD47-кросс-дрессинга клеток CD47КО Jurkat (ФИГ.

7A) с помощью внеклеточных везикул (ФИГ. 7C) или экзосом (ФИГ. 7D) из клеток WT Jurkat (ФИГ. 7B) через 2 часа.

[0034] **ФИГ. 8A – 8D:** Измерение CD47-кросс-дрессинга клеток CD47KO Jurkat (ФИГ. 8A) с помощью внеклеточных везикул (ФИГ. 8C) или экзосом (ФИГ. 8D) из клеток WT Jurkat (ФИГ. 8B) через 6 часов.

[0035] **ФИГ. 9A - 9D:** Измерение CD47-кросс-дрессинга свиных клеток LCL (ФИГ. 9A) с помощью внеклеточных везикул (ФИГ. 9C) или экзосом (ФИГ. 9D) из клеток WT Jurkat через 2 часа.

[0036] **ФИГ. 10A – 10D:** Измерение CD47-кросс-дрессинга свиных клеток LCL (ФИГ. 10A) с помощью внеклеточных везикул (ФИГ. 10C) или экзосом (ФИГ. 10D) из клеток WT Jurkat через 6 часов.

## **8. Подробное описание изобретения**

[0037] В настоящем изобретении предлагаются внеклеточные везикулы («EV», *например*, экзосомы) несущие CD47, и композиции, содержащие их. Такие EV, несущие CD47, могут применяться для кросс-дрессинга тканей и позволяют им избежать фагоцитарного уничтожения макрофагами и другими фагоцитами. Такие способы и композиции могут применяться в ксенотрансплантации. Способы получения EV описаны в разделе 6.1. Композиции, содержащие полученные EV, описаны в разделе 6.2. Способы применения EV для кросс-дрессинга тканей описаны в разделе 6.3. Применение таких тканей в ксенотрансплантации описано в разделе 6.4.

[0038] В контексте данного документа, термины «около» или «приблизительно» имеют значение в пределах 10% от заданного значения или диапазона. В случаях, когда требуются или ожидаются целые числа, а также в случаях процентов, подразумевается, что объем этого термина включает округление в большую сторону до следующего целого числа и округление в меньшую сторону до следующего целого числа. Для ясности, использование в данном документе таких фраз, как «около X» и «по меньшей мере около X», подразумевает, что они охватывают и, в частности, указывают на «X».

[0039] В контексте данного документа, термин «внеклеточная везикула (EV)» обычно относится к закрытым липидной мембраной пузырькам, секретиремым клеткой во внеклеточное пространство, и включает, помимо прочего, экзосомы и/или микровезикулы.

[0040] В контексте данного документа, термин «экзосома» обычно относится к подмножеству EV, которые обычно имеют меньший размер (*например*, 30-150 нм в диаметре) по сравнению с другими EV, такими как микровезикулы.

[0041] В контексте данного документа, термин «кросс-дрессинг» обычно относится к экспрессии трансгенного белка (*например*, CD47) в клетке, которая индуцируется,

например, путем инкубации клетки с клетками или EV, экспрессирующими указанный белок.

## **8.1 Способы получения EV**

### **8.1.1. EV**

**[0042]** Внеклеточные везикулы (EV) представляют собой мембраны, покрытые липидным бислоем, высвобождаются клетками во внеклеточную среду. Примерами EV являются экзосомы, микровезикулы (MV) и апоптотические тельца. *См., например, Carnino et al. Respiratory Research (2019) 20:240.* В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV включают экзосомы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV состоят из экзосом. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения EV включают MV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV состоят из MV.

**[0043]** В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 2000 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 1500 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 500 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 200 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 20 нм до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 50 нм до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 50 нм до около 1500 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 50 нм до около 1000 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV имеют размер от около 50 нм до около 500 нм.

**[0044]** Экзосомы представляют собой один примерный тип EV, подходящий для применения в настоящем изобретении. Различные маркеры для характеристики экзосом известны в данной области техники и включают, помимо прочего, Alix, Tsg101, тетраспанины (*например*, CD63, CD81, CD82, CD53 и CD37) и флотиллин. MV представляют собой еще один примерный тип EV, подходящий для применения в настоящем изобретении, и общие белковые маркеры, применяемые для определения этих везикул, включают, помимо прочего, селектины, интегрины и лиганд CD40.

### 8.1.2. Источники EV

**[0045]** В данном документе предлагаются EV, содержащие CD47, *например*, человеческий CD47. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения CD47, содержащийся в EV, является нативным для клетки, высвобождающей EV. В других примерах CD47 не является нативным для клетки, высвобождающей EV (*например*, трансгенный CD47). В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения CD47 представляет собой человеческий CD47.

**[0046]** Многие типы клеток выделяют EV, и EV могут нести различные типы грузов, такие как нуклеиновые кислоты, белки и липиды, которые высвобождаются клеткой-хозяином. EV, представленные в данном документе, могут высвобождаться клеточными линиями в культуре или первичными клетками в культуре. В типовых вариантах осуществления настоящего изобретения EV высвобождаются из человеческих клеток, *например*, первичных человеческих клеток в культуре. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, высвобождаются из человеческих клеток, экспрессирующих трансгенный CD47. В других конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, высвобождаются из человеческой раковой клетки, *например*, из человеческой раковой клетки, сверхэкспрессирующей CD47 (*например*, лейкозных клеток Jurkat). EV, представленные в данном документе, могут высвобождаться из клеток, которые естественным образом экспрессируют человеческий CD47, или из клеток, которые были модифицированы для рекомбинантной экспрессии человеческого CD47, *например*, клеток, модифицированных, как описано в разделе 6.1.3 ниже. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, высвобождаются из клеток, модифицированных для избыточной экспрессии человеческого CD47, *например*, клеток, модифицированных, как описано в разделе 6.1.3 ниже. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, высвобождаются из клеток, модифицированных для индуцибельной экспрессии человеческого CD47, *например*, клеток, модифицированных, как описано в разделе 6.1.3 ниже. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, выделены из биологических жидкостей, *например*, из крови.

**[0047]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, из которых высвобождаются EV, описанные в данном документе, могут быть обработаны агентами, которые усиливают высвобождение EV. Агенты, усиливающие высвобождение EV из клеток, хорошо известны в данной области техники, *например*, Deng *et al.*,

Theranostics 2021, 11(9):4351-4362; Wang *et al.* Cells 2020, 9(3):660; и Nakamura *et al.*, Molecular Therapy 28(10):2203-2219 October 2020. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения агентом, усиливающим высвобождение EV, является ультразвук, адипонектин, норэпинефрин, форсколин, фенотерол, метилдопамин или мефенезин.

#### 8.1.3. Способы создания трансгенных клеточных линий, высвобождающих EV

**[0048]** Также в настоящем изобретении предлагаются трансгенные клетки (*например*, первичные клетки или клетки клеточных линий), экспрессирующие CD47, которые выделяют EV, несущие CD47. Аминокислотные последовательности человеческого CD47 можно найти под следующими номерами доступа NCBI Reference Sequence (RefSeq): NP\_001768; NP\_001369235.1; NP\_942088; и XP\_005247966.1. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие человеческий CD47, можно найти под следующими номерами доступа NCBI RefSeq: NM\_001777; NM\_198793; XM\_005247909.2 и NM\_001382306.1. Любой известный сплайс-вариант CD47 может быть использован для создания трансгенной клеточной линии, представленной в данном документе. Неограничивающие примеры аминокислотных и нуклеотидных последовательностей человеческого CD47 представлены в Таблице 1.

**[0049]** В данном документе представлены векторы (*например*, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, включающие нуклеотидные последовательности, кодирующие CD47, *например*, человеческий CD47. Векторы могут включать вирусные векторы (*например*, адено-ассоциированный вирус (AAV), самокомплиментарный адено-ассоциированный вирус (scAAV), аденовирус, ретровирус, лентивирус (*например*, вирус иммунодефицита обезьян, вирус иммунодефицита человека или модифицированный вирус иммунодефицита человека), вирус болезни Ньюкасла (NDV), вирус герпеса (*например*, вирус простого герпеса), альфавирус, вирус коровьей оспы и т.д.), плазмиду или другой вектор (*например*, невирусные векторы, такие как липоплексы, липосомы, полимеросомы или наночастицы).

##### 8.1.3.1 Способы создания трансгенных клеточных линий

**[0050]** Трансгенные клетки (включая первичные клетки или клетки клеточной линии) могут быть получены с помощью любого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе.

**[0051]** Трансгенная клеточная линия, представленная в данном документе, может быть сконструирована для экспрессии CD47 (*например*, человеческого CD47) с помощью гомологичной рекомбинации (HR) между клеточной ДНК и экзогенной ДНК (*например*, конструкцией ДНК, вектором и т.д.), введенной в клетку. В качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, представленных в данном

документе, трансген человеческого CD47 вместе со всеми необходимыми регуляторными последовательностями вводится в клеточную линию, например, в виде искусственной хромосомы человека.

**[0052]** Последовательность-специфическая вставка (или нок-ин) трансгена человеческого CD47 в геном клеточной линии также может быть достигнута с помощью последовательность-специфической эндонуклеазы в сочетании с гомологичной рекомбинацией (HR) целевого хромосомного локуса с конструкцией, содержащей трансген человеческого CD47. Meyer *et al.*, 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 15022-15026. Cui *et al.*, 2010, Nat. Biotechnol. 29:64- 67. Meyer *et al.*, 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3055-3060.

**[0053]** Другой пример последовательность-специфической эндонуклеазы, включает РНК-направляемые ДНК-нуклеазы, *например*, систему CRISPR/Cas. В системе Cas9/CRISPR (Кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы, Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats) применяется РНК-направленное связывание ДНК и расщепление целевой специфической последовательности ДНК. Направляющая РНК (gРНК) (*например*, содержащая 20 нуклеотидов) комплементарна целевой последовательности геномной ДНК, расположенной выше геномного сайта PAM (смежные мотивы протоспейсера) (NNG) и константной области каркаса РНК. Белок Cas (CRISPR-ассоциированный) связывается с gРНК и целевой ДНК, с которой связывается gРНК, и вносит двухцепочечный разрыв в определенном месте выше сайта PAM. Geurts *et al.*, 2009, Science 325:433; Mashimo *et al.*, 2010, PLoS ONE 5, e8870; Carbery *et al.*, 2010, Genetics 186:451-459; Tesson *et al.*, 2011, Nat. Biotech. 29:695-696. Wiedenheft *et al.* Nature 2012, 482:331-338; Jinek *et al.* Science, 2012, 337:816-821; Mali *et al.*, 2013, Science 339:823-826; Cong *et al.* 2012, Science 339:819-823.

**[0054]** Последовательность-специфическая эндонуклеаза способов и композиций, описанных в данном документе, может быть сконструированной, химерной или выделенной из организма. Эндонуклеазы можно сконструировать так, чтобы они распознавали специфическую последовательность ДНК, *например*, путем мутагенеза. Seligman *et al.* (2002) Nucleic Acids Research 30: 3870-3879. Комбинаторная сборка представляет собой способ, при котором белковые субъединицы, образующие различные ферменты, могут быть связаны или слиты. Amould *et al.* (2006) Journal of Molecular Biology 355: 443-458. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эти два подхода, мутагенез и комбинаторная сборка, могут быть объединены для получения сконструированной эндонуклеазы с нужной последовательностью распознавания ДНК.

**[0055]** Последовательность-специфическая нуклеаза может быть введена в клетку в

форме белка или в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность-специфическую нуклеазу, такой как мРНК или сДНК. Нуклеиновые кислоты могут быть доставлены в составе более крупной конструкции, такой как плазида или вирусный вектор, или напрямую, *например*, с помощью электропорации, липидных везикул, вирусных транспортеров, микроинъекции и биолистики. Аналогично, конструкция, содержащая один или большее количество трансгенов, может быть доставлена любым способом, подходящим для введения нуклеиновых кислот в клетку.

**[0056]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансгенная клеточная линия, представленная в данном документе, индуцированно экспрессирует человеческий CD47. Многочисленные индуцируемые промоторы и системы экспрессии генов известны в данной области техники. Например, промотор может быть индуцирован химическим веществом, *например*, тетрациклином, тамоксифеном или куматом. Экспрессия генов также может контролироваться белок-белковыми взаимодействиями (*например*, взаимодействием между FKBP12 и mTOR, которое контролируется рапамицином). См., *например*, Kallunki *et al.* (2019), *Cells* 8:796.

**[0057]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения для достижения обусловленного нок-аута гена-мишени может применяться последовательность-специфическая система рекомбинации. Рекомбиназа представляет собой фермент, который распознает специфические полинуклеотидные последовательности (сайты распознавания рекомбиназы), фланкирующие промежуточный полинуклеотид, и катализирует взаимный обмен нитями, в результате чего происходит инверсия или эксцизия промежуточного полинуклеотида. Araki *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 160-164.

**[0058]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения для обусловленного нок-аута гена-мишени в клетке может применяться система Cre-loxP. Указанная система включает в себя целевую интеграцию (нок-ин) сайтов loxP посредством гомологичной рекомбинации (HR) и экспрессии индуцибельной рекомбиназы Cre.

**[0059]** В другом варианте осуществления настоящего изобретения условная экспрессия трансгена (который кодирует, *например*, рекомбиназу или трансген человеческого CD47) может быть достигнута путем применения регуляторной последовательности, которая может быть индуцирована или инактивирована экзогенными стимулами. Например, последовательность-специфическая система рекомбинации аллеля с обусловленным нок-аутом, может регулироваться, *например*, путем индуцирования активности рекомбиназы химическим веществом (препаратом). Химическое вещество может активировать транскрипцию гена рекомбиназы Cre или активировать транспорт белка рекомбиназы Cre в ядро. В качестве альтернативы, рекомбиназа может активироваться в отсутствие вводимого

препарата, а не в его присутствии. Неограничивающие примеры химических веществ, регулирующих индуцибельную систему (таким образом, *например*, вызывая обусловленные нок-ауты), включают тетрациклин, тамоксифен, RU-486, доксициклин и тому подобное. Nagy A (Feb 2000), Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring, *Genesis*, 26 (2): 99-109. *См.*, например, конструкцию обусловленного нокаута и нок-ина, описанную в патентной заявке США № 15/558 789.

#### 8.1.3.2 Внехромосомная экспрессия EV

**[0060]** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы получения EV, в которых CD47 экспрессируется из внехромосомной ДНК. Внехромосомная ДНК представляет собой ДНК, которая не интегрируется в хромосомную ДНК хозяина. Неограничивающие примеры внехромосомной ДНК включают плазмиды и циркулярную внехромосомную ДНК. В эукариотических клетках внехромосомная ДНК может находиться как внутри ядра, так и вне его. Например, клетка-хозяин может быть трансфицирована вектором, кодирующим человеческий CD47 (*например*, вектором, описанным в разделе 6.1.3 выше), и при этом белок человеческого CD47 экспрессируется из вектора без интеграции в ДНК хозяина.

#### 8.1.3.3 Выделение EV из клеток

**[0061]** EV могут быть выделены из клеток (*например*, трансгенных клеток, экспрессирующих CD47) с помощью любого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе. *См.*, *например*, Carnino *et al.* *Respiratory Research* (2019) 20:240.

**[0062]** Например, EV могут быть выделены путем дифференциального центрифугирования супернатанта клеточной культуры. В одном из типовых протоколов клеточный супернатант центрифугируют при 2 000g (3 000 об/мин) в течение 20 минут для удаления клеточного дебриса и мертвых клеток. Затем EV очищают центрифугированием при 16 500g (9 800 об/мин) в течение 45 мин. Экзосомы могут быть получены по аналогичному протоколу, при котором клеточный супернатант центрифугируют при 2 000g (3 000 об/мин) в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса и мертвых клеток, а экзосомы затем выделяют центрифугированием при 100 000g (26 450 об/мин) в течение приблизительно от 2 ч до 16 ч.

**[0063]** EV, включая экзосомы, можно также очистить с помощью центрифугирования в градиенте плотности. В этом способе EV разделяются на основе их плотности плавучести в растворах сахарозы, иогексола или йодиксанола. Другие примеры способов выделения EV, таких как экзосомы, включают осаждение органическими растворителями (*например*, полиэтиленгликолем, ацетатом натрия или протамином), иммунопреципитацию,

разделение с помощью магнитных гранул, покрытых антителами (*например*, магнитных гранул, покрытых анти-CD63), микрофлюидных устройств и ультрафильтрации. *См., например*, Carnino *et al.* Respiratory Research (2019) 20:240 и Momen-Heravi *et al.* Biol. Chem. 2013; 394(10): 1253–1262 для типовых протоколов. Другими типовыми способами являются выделение с помощью агарозных гранул, конъюгированных с гепарином (*см., например*, Balaj *et al.* (2015) Sci Rep 5, 10266), и очистка с помощью Tim4-аффинной очистки (*см., например*, Nakai *et al.* (2016) Sci Rep 6, 33935).

**[0064]** Кроме того, существуют коммерческие наборы для выделения EV, которые могут быть применены для выделения EV, представленных в данном документе. Неограничивающие примеры включают набор exoEasy Kit (Qiagen), наборы ExoQuick® (Systems Bioscience), Total Exosome Isolation Reagent (ThermoFisher Scientific) и EasySep™ Human Pan-Extracellular Vesicle Positive Selection Kit (Stem Cell Technologies).

**[0065]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, выделяют или очищают. EV, представленные в данном документе, могут быть очищены с помощью любого способа, известного в данной области техники или представленного в данном документе. В контексте данного документа, «выделенная» или «очищенная» EV по существу свободна от клеточного материала, микрочастиц или других загрязнений (*например*, органелл, липидов, холестерина) из клетки или ткани, из которой получена EV. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, имеют чистоту около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, имеют чистоту более 99%. Чистота может быть определена, например, путем измерения размера частиц с помощью динамического светорассеяния или анализа отслеживания отдельных частиц, или с помощью таких методов, как проточная цитометрия, ELISA или электронная микроскопия. *См. например*, Balaj *et al.* (2015) Sci Rep 5, 10266, Nakai *et al.* (2016) Sci Rep 6, 33935 и Carnino *et al.* (2019) Respiratory Research 20:240.

#### 8.1.3.4 Анализ для определения уровней mPНК

**[0066]** В данной области техники известно несколько методов обнаружения или количественного определения уровня mPНК. Типовые методы включают, помимо прочего, нозерн-блоттинг, анализ с помощью защиты от рибонуклеазы, методы на основе PCR (*например*, количественная PCR), секвенирование PНК, анализ Fluidigm® и тому подобное. Последовательность mPНК человеческого CD47 может быть использована для приготовления зонда, по меньшей мере частично комплементарного последовательности mPНК. Затем зонд можно использовать для обнаружения mPНК в образце с помощью

любого подходящего анализа, такого как методы на основе PCR, нозерн-блоттинг, анализ с помощью тест-полоски, анализы TaqMan<sup>TM</sup> и т.п.

**[0067]** В других вариантах осуществления настоящего изобретения можно провести анализ нуклеиновой кислоты для тестирования экспрессии человеческого CD47 в биологическом образце. Анализ обычно содержит твердую подложку и по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, контактирующую с подложкой, при этом нуклеиновая кислота соответствует по меньшей мере части мРНК. Анализ также может включать средства обнаружения измененной экспрессии мРНК в образце. Метод анализа можно варьировать в зависимости от типа требуемой информации о мРНК. Типовые методы включают, помимо прочего, нозерн-блоты и методы на основе PCR (*например*, qRT-PCR). Такие методы, как qRT-PCR, также позволяют точно определить количество мРНК в образце.

**[0068]** Типовой метод анализа мРНК может включать следующие этапы: (1) получение поверхностно-связанных исследуемых зондов; (2) гибридизация популяции мРНК с поверхностно-связанными зондами в условиях, достаточных для обеспечения специфического связывания; (3) отмывание после гибридизации для удаления нуклеиновых кислот, не связанных специфически с поверхностно-связанными зондами; и (4) обнаружение гибридизированных мРНК. Реагенты, используемые на каждом из этих этапов, и условия их использования могут варьироваться в зависимости от конкретного применения.

**[0069]** Другие методы, такие как методы на основе PCR, также можно использовать для обнаружения экспрессии человеческого CD47. Примеры методов PCR можно найти в патенте США № 6 927 024, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Примеры методов RT-PCR можно найти в патенте США № 7 122 799, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Метод флуоресцентной PCR *in situ* описан в патенте США № 7 186 507, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количественная PCR с обратной транскрипцией (qRT-PCR) может использоваться как для обнаружения, так и для количественного определения РНК-мишеней (Bustin *et al.* Clin. Sci. 2005, 109:365-379). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анализы на основе qRT-PCR можно применять для измерения уровней мРНК во время клеточных анализов. Примеры методов на основе qRT-PCR можно найти, например, в патенте США № 7 101 663, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

**[0071]** В отличие от обычной PCR с обратной транскриптазой и анализа с помощью агарозных гелей, qRT-PCR дает количественные результаты. Дополнительным

преимуществом qRT-PCR является относительная простота и удобство применения. Инструменты для qRT-PCR, такие как Applied Biosystems 7500, коммерчески доступны, как и реагенты, такие как TaqMan® Sequence Detection Chemistry. Например, анализы экспрессии генов TaqMan® можно применять в соответствии с инструкциями производителя. Эти наборы представляют собой предварительно разработанные анализы экспрессии генов для быстрого и надежного обнаружения и количественной оценки транскриптов мРНК человека, мыши и крысы. Типовая программа qRT-PCR, например, представляет собой 50 °C в течение 2 минут, 95 °C в течение 10 минут, 40 циклов при 95 °C в течение 15 секунд, затем 60 °C в течение 1 минуты.

#### 8.1.3.5 Анализ для обнаружения уровней полипептида или белка

**[0072]** Для измерения уровня человеческого CD47 можно применять несколько методов обнаружения и количественного определения белка. Можно применять любой подходящий метод количественного определения белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения применяются методы на основе антител. Примеры методов, которые можно использовать, включают, помимо прочего, иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг), ELISA, иммуногистохимию, иммунофлуоресценцию, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), цитометрию с массивом гранул, масс-спектроскопию и тому подобное. Обычно используются несколько типов ELISA, включая прямой анализ ELISA, непрямой анализ ELISA и сэндвич-ELISA.

## 8.2 EV Композиции

**[0073]** В настоящем изобретении представлены композиции, содержащие EV, описанные в данном документе, *например*, EV, несущие CD47, такие как экзосомы, несущие CD47 ("композиции EV"). Очищенные EV можно криоконсервировать, *например*, путем замораживания EV в присутствии криопротектора, лиофилизировать или высушить распылением. EV можно стабилизировать с помощью гидрофильных полимеров (*например*, полиэтиленгликоля) или скаффолдов (*например*, скаффолдов, содержащих компоненты внеклеточного матрикса, с которыми EV связываются *in vivo*). См., *например*, Kusuma *et al.* (2018) Front. Pharmacol., 9:1199.

**[0074]** Композиции EV, представленные в данном документе, могут отличаться по содержанию CD47. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения EV содержит мРНК CD47. Уровень мРНК человеческого CD47 может быть определен любым пригодным методом, известным в данной области техники, *например*, методом, описанным в разделе 6.1.3.4. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения EV содержит полипептид или белок CD47. Уровень белка человеческого CD47 может быть определен с помощью любого подходящего метода, известного в данной области техники,

*например*, метода, описанного в разделе 6.1.3.5.

**[0075]** Так, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% EV, присутствующих в единице композиции EV, экспрессируют человеческий CD47. Аналогично, человеческий CD47 может составлять по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% от общего количества мембраноассоциированного белка в составе EV.

**[0076]** Композиции EV, представленные в данном документе, могут дополнительно включать пригодный носитель, *например*, фармацевтически приемлемый носитель. Как правило, «фармацевтически приемлемый» носитель представляет собой материал, который не является биологически или иным образом нежелательным, *т.е.* материал может быть введен субъекту, не вызывая при этом каких-либо нежелательных биологических эффектов, таких как токсичность. Типовые фармацевтически приемлемые носители включают, помимо прочего, водные растворители (*например*, воду; сбалансированные солевые растворы, такие как фосфатно-солевой буфер (PBS), сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HSB), сбалансированный солевой раствор Эрла (EBSS); и среды для культивирования клеток), а также неводные растворители (*например*, жиры, масла, полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), растительное масло и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат). Носитель включает жидкие, полутвердые, например, пасты, или твердые носители. Кроме того, если желательно, композиции могут содержать незначительное количество вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, стабилизаторы или агенты, буферизирующие pH. pH и точная концентрация различных компонентов в фармацевтической композиции регулируются в соответствии с известными параметрами. Соответственно, EV по настоящему изобретению могут быть составлены для введения в фармацевтически приемлемый носитель в соответствии с известными методиками. См., *например*, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (22nd Ed. 2012).

**[0077]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 0,01% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 0,05% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 0,1% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 0,5% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может

содержать от 1% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 5% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 10% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 15% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 20% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 25% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 30% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 35% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 40% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 50% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 55% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 60% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 70% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 75% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 80% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 85% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 90% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать от 95% до 99% по объему EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция может содержать 100% EV, например, лиофилизированных EV.

**[0078]** Количество EV, включенных в композиции, представленные в данном документе, может быть легко определено специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, достаточное для кросс-дрессинга ксенотрансплантата. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV является достаточным для перекрестной деформации ксенотрансплантата и снижения фагоцитоза клеток органа. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV является

достаточным для кросс-дрессинга ксенотрансплантата и снижения системного воспаления у реципиента после трансплантации.

**[0079]** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количественную величину. В данной области техники известны различные методы количественного определения EV, включая MV и экзосомы. Например, не ограничивающие типовые методы количественного определения EV включают электронную микроскопию (EM), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), проточную цитометрию, перестраиваемое резистивное импульсное зондирование (TRPS), анализ траекторий наночастиц Nanosight, методы на основе белков и иммуноферментный анализ.

**[0080]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^6$  до около  $1,0 \times 10^{15}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^7$  до около  $1,0 \times 10^{14}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^8$  до около  $1,0 \times 10^{13}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^9$  до около  $1,0 \times 10^{12}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^{10}$  до около  $1,0 \times 10^{11}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^6$  до около  $1,0 \times 10^{10}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^6$  до около  $1,0 \times 10^8$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^8$  до около  $1,0 \times 10^{15}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^8$  до около  $1,0 \times 10^{12}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^{10}$  до около  $1,0 \times 10^{15}$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает от около  $1,0 \times 10^{12}$  до около  $1,0 \times 10^{15}$  EV.

**[0081]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает около  $1,0 \times 10^6$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает около  $1,0 \times 10^7$  EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция, представленная в данном документе, включает около  $1,0 \times 10^8$  EV.







представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^5$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^6$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^7$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^8$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^9$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^{10}$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^{11}$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^{12}$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^{13}$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^{14}$  клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения количество EV представляет собой количество, собранное из около  $1,0 \times 10^{15}$  клеток.

### **8.3 Способы применения EV для кросс-дрессинга тканей**

[0087] В контексте данного документа, термин «кросс-дрессинг» описывает экспрессию трансгенного белка (*например*, CD47) в клетке, которая индуцируется, например, путем инкубации клетки с клетками или EV, экспрессирующими указанный белок. Например, свиные клетки могут быть кросс-дрессингированы человеческим CD47 путем воздействия на клетки, экспрессирующие человеческий CD47, *например*, в результате совместной инкубации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, инкубируют с тканью костного мозга свиньи-донора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, инкубируют с почкой свиньи-донора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, инкубируют как с тканью костного мозга, так и с почкой от одной и той же свиньи-донора. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV, представленные в данном документе, инкубируют с почкой от первой свиньи-донора и тканью костного мозга от второй свиньи-донора.

### **8.4 Способы применения EV в ксенотрансплантации**

[0088] В настоящем изобретении предлагаются способы ксенотрансплантации,

содержащие кросс-дрессинг ксенотрансплантата белком CD47 (*например*, человеческим CD47) перед имплантацией ксенотрансплантата в ткань-мишень. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения тканью-мишенью является ткань почки. В других вариантах осуществления настоящего изобретения тканью-мишенью является ткань легкого. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения тканью-мишенью является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью-мишенью не экспрессирует SIRP $\alpha$  (*например*, человеческий SIRP $\alpha$ ), как определено методом, известным в данной области техники (*например*, вестерн-блоттингом, проточной цитометрией или количественной полимеразной цепной реакцией). В определенных аспектах кросс-дрессинг CD47 не зависит от экспрессии сигнального регуляторного белка  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) на ткани-мишени.

#### 8.4.1. Способы воздействия EV на ксенотрансплантаты

**[0089]** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг достигается путем воздействия на ксенотрансплантат внеклеточными везикулами EV, содержащими CD47. В других вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг достигается путем совместного культивирования ксенотрансплантата с клеточной линией, экспрессирующей человеческий CD47 (*например*, трансгенной клеточной линией). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV *in vivo*. Например, EV, такие как экзосомы, могут быть введены через ретроорбитальный венозный синус, хвостовую вену или внутрисердечно, или аналогичным способом для доставки EV *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV *ex vivo*. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения сосуды ксенотрансплантата перфузируются EV *in vivo*. Например, ксенотрансплантат можно перфузировать *in vivo* либо донору, либо реципиенту, либо обоим. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сосуды ксенотрансплантата перфузируются EV *ex vivo*.

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV более одного раза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз в течение 1, 2 или 3 дней. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат неоднократно подвергается воздействию одной и той же композиции EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию

различных композиций EV.

**[0091]** В контексте данного документа, воздействие EV на ксенотрансплантат может происходить до трансплантации, после трансплантации или до и после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV до и после трансплантации.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию после трансплантации более одного раза. Например, реципиенту после трансплантации можно вводить EV один или большее количество раз (*например*, посредством внутривенной инфузии). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реципиенту вводят EV ежедневно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реципиенту вводят EV более одного раза в день. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реципиент получает инфузию.

**[0093]** В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения в орган *in vivo* непосредственно вводят EV до трансплантации, после трансплантации или до и после трансплантации. Например, орган может быть перфузирован непосредственно (*например*, через печеночную воротную вену) до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган непосредственно перфузируется *in vivo* до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган непосредственно перфузируется *in vivo* после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган непосредственно перфузируется *in vivo* до и после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган непосредственно перфузируется *in vivo* более одного раза до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган непосредственно перфузируется *in vivo* более одного раза после трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения орган непосредственно перфузируется *in vivo* более одного раза до и после трансплантации.

**[0094]** Воздействие EV на ксенотрансплантат может осуществляться в течение любого времени, достаточного для кросс-дрессинга ксенотрансплантата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV в течение около 1-2 часов, 2-3 часов, 3-4 часов, 4-5 часов, 5-6 часов, 6-7 часов, 7-8 часов, 8-9 часов, 9-10 часов, 10-11 часов или 11-12 часов. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV в течение около 12-16 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV в течение около 16-24 часов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ксенотрансплантат подвергается воздействию EV в течение более чем 24 часов.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения EV разработаны таким образом, чтобы улучшить их доставку в определенный орган или тип клеток. Различные методы создания EV с таргетными свойствами известны в данной области техники (*см., например*, Murphy, D.E., *et al.* Exp Mol Med 51, 1–12 (2019)). Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения EV экспрессируют специфический таргетный пептид, который улучшает нацеливание EV на предполагаемые клетки действия. Другой типовой метод нацеливания включает в себя создание EV для экспрессии специфических комбинаций интегринов, которые улучшают нацеливание EV на предполагаемые клетки действия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструирование выполняется после продуцирования EV.

#### 8.4.2. Эффекты воздействия EV на ксенотрансплантаты

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг CD47 на клетки приводит к тому, что эти клетки уклоняются от фагоцитоза. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения кросс-дрессинг CD47 на клетки приводит к тому, что эти клетки уклоняются от фагоцитоза без индукции апоптоза.

**[0097]** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CD47, полученные в соответствии с настоящим изобретением, например, с помощью способов, описанных в разделе 6.4, экспрессируют CD47 с пониженным связыванием с лигандами CD47 (*например*, тромбоспондином (TSP-1)) по сравнению с клетками, экспрессирующими CD47, которые не были подвергнуты кросс-дрессингу с CD47 из EV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CD47, полученные в соответствии с настоящим изобретением, например, с помощью способов, описанных в разделе 6.4, экспрессируют CD47 без лигирования с лигандами CD47 (*например*, тромбоспондином (TSP-1) или SIRP $\alpha$ ) или с необнаруживаемым уровнем лигирования по сравнению с клетками, экспрессирующими CD47, которые не были подвергнуты кросс-дрессингу с CD47 из EV.

**[0098]** Связывание CD47 с TSP-1, например, может вызвать воспаление и гибель клетки, экспрессирующей CD47. Тем не менее, настоящее изобретение частично основано на выводах о том, что кросс-дрессингированные клетки CD47 не передают апоптотический сигнал. И наоборот, клетки, не подвергшиеся кросс-дрессингу CD47 и эндогенно или

экзогенно экспрессирующие CD47, подвергаются клеточной гибели и усиливают воспаление. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки, экспрессирующие CD47, полученные по настоящему изобретению, демонстрируют пониженную клеточную гибель по сравнению с клетками, экспрессирующими CD47, которые не были не были кросс-дрессингованными с CD47 из EV. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки с кросс-дрессингом CD47, полученные в соответствии с настоящим изобретением, демонстрируют снижение клеточной гибели при воздействии SIRP $\alpha$  или его фрагментов, химер и/или слияния, по сравнению с клетками, экспрессирующими CD47, которые не были кросс-дрессингованными с CD47 из EV. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения клетки с кросс-дрессингом CD47, полученные в соответствии с настоящим изобретением, демонстрируют снижение гибели клеток при воздействии около 50 нМ человеческого SIRP $\alpha$ -Fc в течение 1 ч по сравнению с клетками, экспрессирующими CD47, не были кросс-дрессингованными с CD47 из EV и подвергнутыми воздействию такого же количества SIRP $\alpha$ -Fc.

**[0099]** Фагоцитоз может быть определен любым способом, известным в данной области техники или описанным в данном документе, *например*, описанным в Примере 4. Например, клетки могут быть помечены фиолетовым Celltrace и инкубированы с человеческими макрофагами. Затем уровень фагоцитоза можно измерить с помощью проточной цитометрии, чтобы определить процент макрофагов (CD14-положительных клеток), которые поглотили меченые клетки-мишени. В настоящем изобретении предлагается способ кросс-дрессинга ксенотрансплантата, включающий воздействие на ксенотрансплантат внеклеточными везикулами EV, содержащими человеческий CD47, перед трансплантацией, при этом указанный способ снижает фагоцитоз ксенотрансплантата на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с не кросс-дрессингованным ксенотрансплантатом.

**[00100]** В определенных вариантах осуществления способ ксенотрансплантации, представленный в данном документе, приводит к снижению фагоцитоза без индукции апоптоза. Апоптоз может быть измерен с помощью любого способа, известного в данной области техники, или способа, описанного в данном документе. Например, апоптоз может быть измерен путем окрашивания клеток йодистым пропидием (PI) или PI и Annexin V. Апоптоз может быть незаметным или может уменьшаться на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с ксенотрансплантатом, экспрессирующим аллогенный CD47.

**[00101]** Уклонение от фагоцитоза может привести к более длительному выживанию клетки и, как следствие, к длительному химеризму. Например, кросс-дрессинг человеческого CD47 в клетку костного мозга свиньи может позволить клетке костного мозга свиньи избежать фагоцитоза после трансплантации реципиенту-человеку, что приведет к длительному выживанию клетки костного мозга свиньи. Более длительное выживание клеток костного мозга свиньи, в свою очередь, может привести к длительному химеризму, что может быть полезно для предотвращения отторжения трансплантата.

**[00102]** В настоящем изобретении кросс-дрессинг ксенотрансплантата посредством EV, содержащими человеческий CD47, перед трансплантацией уменьшает воспаление ксенотрансплантата. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения воспаление ксенотрансплантата может быть незаметным или может уменьшаться на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55 %, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с ксенотрансплантатом, экспрессирующим аллогенный CD47.

**[00103]** Также в настоящем изобретении кросс-дрессинг ксенотрансплантата с EV, содержащими человеческий CD47, перед трансплантацией может уменьшить системное воспаление у реципиента. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения системное воспаление у реципиента после трансплантации ксенотрансплантата может быть незаметным или может уменьшаться на около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, по сравнению с посттрансплантационным ксенотрансплантатом, экспрессирующим аллогенный CD47.

**[00104]** Отторжение трансплантата является серьезной проблемой для многих реципиентов ксенотрансплантатов, что часто требует длительного применения иммуносупрессивной терапии, а уклонение от фагоцитоза может снизить отторжение ксенотрансплантатов у реципиента. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения предлагаются способы снижения отторжения ксенотрансплантатов у реципиента, при этом указанный способ включает в себя воздействие на ксенотрансплантат внеклеточными везикулами EV, содержащими человеческий CD47, до трансплантации.

**[00105]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к уменьшению введения (*например*, уменьшению введения на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или более 90%) иммуносупрессивной терапии реципиенту по сравнению с реципиентом ксенотрансплантата, который не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В конкретных вариантах осуществления настоящего

изобретения указанный способ приводит к уменьшению введения (*например*, уменьшению введения на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или более 90%) иммуносупрессивной терапии реципиенту по сравнению с количеством иммуносупрессивной терапии, которая обычно назначается сопоставимому реципиенту (*например*, человеку того же пола и сопоставимого возраста, роста и/или веса, который получил тот же тип ткани или органа, что и реципиент), при этом сопоставимый реципиент получил ксенотрансплантат, который не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к уменьшению введения (*например*, уменьшению введения на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или более 90%) иммуносупрессивной терапии реципиенту по сравнению со стандартом лечения в сопоставимых клинических условиях. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к уменьшению введения (*например*, уменьшению введения на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или более 90%) иммуносупрессивной терапии реципиенту по сравнению с количеством иммуносупрессивной терапии, которое требовалось указанному реципиенту после получения предыдущего ксенотрансплантата, при этом предыдущий ксенотрансплантат не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к уменьшению введения (*например*, уменьшению введения на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или более 90%) иммуносупрессивной терапии реципиенту по сравнению с количеством иммуносупрессивной терапии, необходимой в сопоставимых клинических условиях, при этом ксенотрансплантат в сопоставимых клинических условиях не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к тому, что реципиенту не требуется дальнейшее введение иммуносупрессивной терапии, *например*, иммуносупрессивной терапии, описанной в разделе 6.4.3 ниже.

**[00106]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к увеличению жизнеспособности ксенотрансплантата по сравнению с ксенотрансплантатом, который не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ приводит к увеличению жизнеспособности (*например*, увеличению жизнеспособности на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-75%, 75-100%, 100-200%, 200-300% или более чем на 300%; или увеличению на 1-2 года, 2-3 года, 3-4 года, 4-

5 лет, 5-6 лет, 6-8 лет, 8-10 лет, 10-15 лет или 15-20 лет) ксенотрансплантата по сравнению с сопоставимым ксенотрансплантатом (*например*, тот же тип ткани или органа, что и у реципиента), трансплантированным сопоставимому реципиенту (*например*, пациенту того же пола и сопоставимого возраста, роста и/или веса), при этом сопоставимый ксенотрансплантат не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к увеличению жизнеспособности (*например*, увеличению жизнеспособности на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-75%, 75-100%, 100-200%, 200-300% или более чем на 300%; или увеличению на 1-2 года, 2-3 года, 3-4 года, 4-5 лет, 5-6 лет, 6-8 лет, 8-10 лет, 10-15 лет или 15-20 лет) ксенотрансплантата по сравнению с жизнеспособностью ксенотрансплантата, полученного ранее данным реципиентом, при этом полученный ранее ксенотрансплантат не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации.

**[00107]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к увеличению жизнеспособности (*например*, увеличению жизнеспособности на около 10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-75%, 75-100%, 100-200%, 200-300% или более чем на 300%; или увеличению на 1-2 года, 2-3 года, 3-4 года, 4-5 лет, 5-6 лет, 6-8 лет, 8-10 лет, 10-15 лет или 15-20 лет) по сравнению с жизнеспособностью ксенотрансплантата в сопоставимых клинических условиях, при этом ксенотрансплантат в сопоставимых клинических условиях не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации.

**[00108]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к улучшению качества жизни, связанного со здоровьем, у реципиента по сравнению с реципиентом ксенотрансплантата, который не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к улучшению качества жизни, связанного со здоровьем, у реципиента по сравнению с аналогичным реципиентом (*например*, человеком того же пола и сопоставимого возраста, роста и/или веса, получившим тот же тип ткани или органа, что и реципиент), при этом аналогичный реципиент получил ксенотрансплантат, который не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к улучшению качества жизни реципиента, связанного со здоровьем, по сравнению с качеством жизни, связанным со здоровьем, которое было у реципиента после предыдущей ксенотрансплантации. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к

улучшению качества жизни, связанного со здоровьем, у реципиента по сравнению с сопоставимыми клиническими условиями, при этом ксенотрансплантат в сопоставимых клинических условиях не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации. Качество жизни, связанное со здоровьем, относится к общему влиянию аспектов здоровья на качество жизни человека и включает физические симптомы, функциональный статус, психологическое состояние и социальные отношения. Качество жизни, связанное со здоровьем, можно оценить с помощью любого инструмента, известного в данной области техники, включая, например, опросник в краткой форме из 36 пунктов (SF-36), опросник EuroQol-5 Dimensions (EQ-5D) и опросник оценки качества жизни при заболеваниях почек (Kidney Disease Quality of Life Instrument, KDQOL). См., например, Parizi *et al.* The Patient - Patient-Centered Outcomes Research (2019) 12:171–181.

**[00109]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к увеличению выживаемости (*например*, на 10-20%, 20-30%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или 90-100%; или в 2-3 раза, 3-5 раз, 5-7 раз, 7-10 раз или 10-15 раз) реципиента трансплантата по сравнению с реципиентом ксенотрансплантата, который до трансплантации не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к увеличению выживаемости (*например*, на 10-20%, 20-30%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или 90-100%; или в 2-3 раза, 3-5 раз, 5-7 раз, 7-10 раз или 10-15 раз) реципиента трансплантата по сравнению с выживаемостью сопоставимого реципиента (*например*, человек того же пола и сопоставимого возраста, роста и/или веса, получивший тот же тип ткани или органа, что и реципиент), при этом сопоставимый реципиент получил ксенотрансплантат, который не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47. В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный способ приводит к увеличению выживаемости (*например*, на 10-20%, 20-30%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90% или 90-100%; или в 2-3 раза, 3-5 раз, 5-7 раз, 7-10 раз или 10-15 раз) реципиента трансплантата по сравнению с выживаемостью реципиента трансплантата в сравнимых клинических условиях, при этом ксенотрансплантат в сравнимых клинических условиях не подвергался воздействию EV, содержащих человеческий CD47, до трансплантации.

**[00110]** В одном из аспектов настоящего изобретения описанные в данном документе способы трансплантации приводят к снижению риска, тяжести или продолжительности протеинурии. При показателях экскреции белка выше 150 мг в день обычно подтверждают диагноз протеинурии. Для измерения концентрации белка в моче часто применяют погружной стержень. Это полуколичественный метод, результаты которого выражаются

следующим образом: отрицательный, следы, 1+, 2+, 3+ или 4+. См. например, Carroll and Temte, Am Fam Physician 62(6):1333-1340 (2000). Для количественного анализа можно измерить общий уровень белка или только уровень альбумина. Результаты могут быть выражены в уровнях общего белка или альбумина, или в соотношении альбумина к креатину или соотношению белка к креатину.

**[00111]** В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения описанные в данном документе способы трансплантации приводят к уменьшению выраженности протеинурии. В отдельных вариантах осуществления изобретения описанные в данном документе способы трансплантации приводят к уменьшению продолжительности протеинурии. Например, выраженность протеинурии у пациента, получающего лечение в соответствии с приведенными в данном документе способами, может быть снижена по сравнению с выраженностью протеинурии, наблюдаемой у пациента, получающего донорскую почку, при этом донорская почка не была подвергнута кросс-дрессingu человеческим CD47.

**[00112]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения выраженность протеинурии, определяемая по уровню белка в моче, снижается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более 95%. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента, получающего лечение в соответствии с представленным в данном документе способом, не возникает протеинурии, определяемой как выделение с мочой более 150 мг белка в сутки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения у пациента, получающего лечение в соответствии с представленным в данном документе способом, может наблюдаться преходящая протеинурия, которая проходит через 1, 2, 3, 3-7, 7-10, 10-14 дней, или 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8 недель, или 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев после трансплантации.

**[00113]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация общего белка в моче реципиента, получающего лечение описанным в данном документе способом, при развитии протеинурии составляет менее чем около 60 мг в день, менее чем около 80 мг в день, менее чем около 100 мг в день, менее чем около 120 мг в день, менее чем около 140 мг в день, менее чем около 160 мг в день, менее чем около 200 мг в день, менее чем около 220 мг в день, менее чем около 240 мг в день, менее чем около 260 мг в день, менее чем около 280 мг в день, менее чем около 300 мг в день, менее чем около 320 мг в день, менее чем около 340 мг в день, менее чем около 360 мг в день, менее чем около 380 мг в день или менее чем около 400 мг в день.

**[00114]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения концентрация альбумина в моче реципиента, получающего лечение описанным в данном документе

способом, при развитии протеинурии составляет менее чем около 5 мг в день, менее чем около 10 мг в день, менее чем около 20 мг в день, менее чем около 30 мг в день, менее чем около 40 мг в день, менее чем около 50 мг в день, менее чем около 60 мг в день, менее чем около 70 мг в день, менее чем около 80 мг в день, менее чем около 90 мг в день или менее чем около 100 мг в день.

**[00115]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения отношение белка к креатинину в 24-часовом образце мочи пациента, получающего лечение в соответствии с описанными в данном документе способами, составляет менее чем около 0,2, менее чем около 0,4, менее чем около 0,6, менее чем около 0,8 или менее чем около 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соотношение альбумина к креатинину в 24-часовом образце мочи пациента, получающего лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет менее чем около 0,02, менее чем около 0,04, менее чем около 0,06, менее чем около 0,08 или менее чем около 0,1.

**[00116]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения риск развития протеинурии у реципиента, получающего лечение описанным в данном документе способом, снижается на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с риском у реципиента донорской почки, в которого донорская почка не подвергалась кросс-дрессингу человеческим CD47.

#### 8.4.3. Дополнительные методы лечения

**[00117]** В определенном аспекте пациент, получавший лечение в соответствии с описанными в данном документе способами, подвергается дополнительному лечению. Пациент может получать дополнительное лечение с помощью одного или большего количества различных способов. Дополнительное лечение может проводиться до, одновременно или после способа лечения, описанного в данном документе.

**[00118]** В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения пациенту, получающему ксенотрансплантат в соответствии с описанными в данном документе способами, проводится внутрикостная трансплантация костного мозга (IBBM). В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения костный мозг берут из того же источника, что и ксенотрансплантат. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения костный мозг экспрессирует человеческий CD47.

**[00119]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий ксенотрансплантат в соответствии со способами, описанными в данном документе, получает иммуносупрессивную терапию. Иммуносупрессивная терапия может представлять собой любое одобренное FDA лечение, направленное на снижение отторжения трансплантата и/или улучшение результатов ксенотрансплантации.

Неограничивающие примеры иммуносупрессивной терапии включают ингибиторы кальциневрина (*например*, такролимус или циклоспорин), антипролиферативные средства (*например*, антиметаболиты, такие как микофенолат, 6-меркаптопурин или его пролекарство азатиоприн), ингибиторы мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR) (*например*, сиролимус, рапамицин), стероиды (*например*, преднизон), ингибиторы клеточного цикла (азатиоприн или микофенолат мофетил), средства, разрушающие лимфоциты (*например*, антитимоцитарный глобулин или антитела, такие как алектумаб, сиплизумаб или базиликсимаб) и блокаторы ко-стимуляции (*например*, белатасепт). См., *например*, Chung *et al* (2020), Ann Transl Med. Mar; 8(6): 409; van der Mark *et al.* (2020), Eur Respir Rev; 29: 190132 and Benvenuto *et al.* (2018), J Thorac Dis 10:3141-3155.

**[00120]** Иммуносупрессивная терапия может назначаться в качестве индукционной терапии (периоперационной или сразу после операции), поддерживающей дозы или при остром отторжении. Индукционная терапия обычно включает базиликсимаб, антитимоцитарный глобулин или алектумаб. Иммуносупрессивная терапия может также назначаться в качестве поддерживающей терапии, которая часто должна продолжаться в течение всей жизни реципиента. Поддерживающая иммуносупрессивная терапия обычно включает ингибитор кальциневрина (такролимус или циклоспорин), антипролиферативный препарат (микофенолат или азатиоприн) и кортикостероиды. Иммуносупрессивная терапия при остром отторжении обычно включает тимоглобулин или микофенолат. См., *например*, Chung *et al.* (2020), Ann Transl Med. Mar; 8: 409, а также Benvenuto *et al.*, (2018) J Thorac Dis 10:3141-3155.

**[00121]** Неограничивающие примеры иммунодепрессантов включают: (1) антиметаболиты, такие как ингибиторы синтеза пуринов (*например*, ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы (IMPDH), *например*, азатиоприн, микофенолат и микофенолат мофетил), ингибиторы синтеза пиримидинов (*например*, лефлуномид и терифлуномид) и антифолаты (*например*, метотрексат); (2) ингибиторы кальциневрина, такие как такролимус, циклоспорин А, пимекролимус и воклоспорин; (3) ингибиторы TNF-альфа, такие как талидомид и леналидомид; (4) антагонисты рецептора IL-1, такие как анакинра; (5) ингибиторы рапамицина (mTOR), такие как рапамицин (сиролимус), дефоролимус, эверолимус, темсиролимус, зотаролимус и биолимус А9; (6) кортикостероиды, такие как преднизон; и (7) антитела к любой из ряда клеточных или сывороточных мишеней (включая анти-лимфоцитарный глобулин и анти-тимоцитарный глобулин).

**[00122]** Неограничивающие типовые клеточные мишени и соответствующие им соединения-ингибиторы включают, помимо прочего, компонент комплемента 5 (*например*,

экулизумаб); факторы некроза опухоли (TNF) (*например*, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, афелимомаб и голимумаб); IL-5 (*например*, меполизумаб); IgE (*например*, омализумаб); VAYX (*например*, нерелимомаб); интерферон (*например*, фаралимомаб); IL-6 (*например*, элселимомаб); IL-12 и IL-13 (*например*, лебрикизумаб и устекинумаб); CD3 (*например*, муромонаб-CD3, отеликсизумаб, теплизумаб, визилизумаб); CD4 (*например*, кленоликсимаб, келиксимаб и занолимумаб); CD1a (*например*, эфализумаб); CD18 (*например*, эрлизумаб); CD20 (*например*, афутузумаб, окрелизумаб, пасколизумаб); CD23 (*например*, люмиликсимаб); CD40 (*например*, тенеликсимаб, торализумаб); CD62L/L-селектин (*например*, аселизумаб); CD80 (*например*, галиксимаб); CD147/базисин (*например*, гавилимомаб); CD154 (*например*, руплизумаб); BlyS (*например*, белимумаб); CTLA-4 (*например*, ипилимумаб, тремелимумаб); CAT (*например*, бертилимумаб, лерделимумаб, метелимумаб); интегрин (*например*, натализумаб); рецептор IL-6 (*например*, тоцилизумаб); LFA-1 (*например*, одулимумаб); и рецептор IL-2/CD25 (*например*, базиликсимаб, даклизумаб, инолимумаб).

#### 8.4.4. Популяция пациентов

**[00123]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способами, описанными в данном документе (*например*, реципиент ксенотрансплантата, который был подвергнут кросс-дрессингу человеческим CD47), представляет собой пациента-человека. В контексте данного документа термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и включают любого человека или млекопитающего, отличного от человека. Неограничивающие примеры включают представителей видов человека, лошади, свиньи, крупного рогатого скота, крысы, мыши, собаки и кошки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является примат, отличный от человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, субъектом является человек. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения субъект представляет собой взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект является ребенком. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является человек, и он получает один или большее количество донорских трансплантатов от донора-свиньи. В других конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения субъект представляет собой примата, отличного от человека (*например*, павиана, яванского макаки или макаки-резуса) и получает один или большее количество трансплантатов от донора-свиньи.

**[00124]** В одном аспекте пациент, получавший лечение в соответствии с описанными в данном документе способами, нуждается в трансплантации почки. Пациент может

нуждаться в трансплантации почки из-за почечной недостаточности или отторжения донорской почки. Почечная недостаточность может иметь ряд причин, включая, помимо прочего, высокое кровяное давление (гипертензию), физические травмы, диабет, заболевания почек (поликистоз почек, клубочковые заболевания) и аутоиммунные заболевания, такие как волчанка. Почечная недостаточность может быть острой или хронической. Почечную недостаточность также можно диагностировать с помощью лабораторных тестов, таких как скорость клубочковой фильтрации, азот мочевины крови и креатинин сыворотки, с помощью визуализирующих методов (ультразвуковое исследование, компьютерная томография) или биопсии почки.

**[00125]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет заболевание почек 1 стадии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет заболевание почек 2 стадии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет заболевание почек 3 стадии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет заболевание почек 4 стадии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет заболевание почек 5 стадии.

**[00126]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет скорость клубочковой фильтрации (GFR) около 90 или выше. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет GFR около 60-90. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет GFR около 30-60. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет GFR около 15-30. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения пациент, получающий лечение в соответствии со способом, описанным в данном документе, имеет GFR около 15 или менее.

Таблица 1: Таблица последовательностей

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
предшественник изоформы 1 поверхностного антигена CD47 лейкоцитов [Homo sapiens] (NCBI Эталонная последовательность : NP_001768.1	1	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFC NDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIY TFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDSLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVV SWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAIL VIQVIAAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSIL ALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLN AFKESKGMNDE
CD47 молекула [Homo sapiens (человек)] NCBI Эталонная последовательность : NP_942088	2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFC NDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIY TFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDSLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVV SWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAIL VIQVIAAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSIL ALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN
предшественник изоформы 3 поверхностного антигена CD47 лейкоцитов [Homo sapiens]  NCBI Эталонная последовательность : NP_001369235.1	3	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFC NDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIY TFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDSLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVV SWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAIL VIQVIAAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSIL ALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLN E
Изоформа X2 поверхностного	4	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFC NDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIY

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
антигена CD47 лейкоцитов Homo sapiens  NCBI Эталонная последовательность : XP_005247966.1		TFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKM DKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIHELKYRVV SWFSPNENILVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLK NATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAIL VIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSIL ALAQLLGLVYMKFVE
Молекула CD47 (CD47) Homo sapiens, вариант транскрипта 1, мРНК  NCBI Эталонная последовательность : NM_001777	5	GCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCCTGTGACGC GCGGCGGCGGTCGGTCCTGCCTGTAACGGCGG CGGCGGCTGCTGCTCCGGACACCTGCGGCGGC GCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGATGT GGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCG GCGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAAT AAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAA TGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAA TATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACG TAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTAC ACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGT CCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAG TCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTG AAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACAC AGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTA CCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGA AAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTGGCT ATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTTAA AACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGA GAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGT GATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGC TACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATTAATTACTTCACTACTATGTGTTTAG

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p>TACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGC  CATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCT  CGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGC  GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTT  AGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACT  TGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAA  TCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTG  TAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCA  AAAGGAATGATGAATGATGAATAACTGAAGTG  AAGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAG  ACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTTAAAGCACC  ATGGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGAGAAGA  ACAAGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAG  ACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTTTATTC  AAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAATAATT  ATGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAG  TTTTTTGTTGTTATTTTTAATCAATTAGGGGCA  ATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGC  CTTTCAGGTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTA  ACCAGTTTAAATTGGTTCAGGGTGATAACTAC  TTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATAT  CTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCTTT  GCCAACTCAGGTTACAGCAGCTTTGGGCAGT  TATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCT  GCCACTTCTGGGTCAATGGAATAATAAATTA  GTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTG  TATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAG  ATAGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTTGCCATTCC  CACATTCCCCTTCAACAACAGTGTAACAGG  TCCTTCCCAGATTTAGGGTACTTTTATTGATGG  ATATGTTTTCTTTTATTCACATAACCCCTTGA  AACCTGTCTTGTCTCCTGTTACTTGCTTCTG</p>

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		CTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCTCCTCTTTG AACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTTG CAGGAAGGAGCCAGACTTGTTCAGAGCACT GTGTTACACTTTTCAGCAAAAATAGCTATGGT TGTAACATATGTATTCCCTTCCTCTGATTTGAA GGCAAAAATCTACAGTGTTTCTTCACTTCTTTT CTGATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAA ATTTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAA AATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGC CCTTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTAT GTTGCATGATAAACATTCATCACCTTCCTCCTG TAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCTATGAT TGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCTATCC TGGTTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTTG TGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCAT TCGTTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGT TGTGCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCT TCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGA GAGCAAAGGTTAATTTTGTGCTTTTAGTAAAA ACATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGTGGA ATTATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAA ACTTTTAAAACCTTCTAGGTAATTTGCCACGCTT TTTGACTGCTACCAATACCCTGTAAAAATAC GTAATTCTTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCA TATTTGTAGTTGCATTAATAATAGTTATTTCTT AGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTAT GCCAAATTGATTGTCATATTTTCATGTTGGGACC AAGTAGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATTTAT GACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCAT ACTAGCAAGACAGCTCTTCTTGAAAAAAAAAA TATGTATACACAAATATATACGTATATCTATAT ATACGTATGTATATACACACATGTATATTCTTC

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		CTTGATTGTGTAGCTGTCCAAAATAATAACAT ATATAGAGGGAGCTGTATTCCTTTATACAAAT CTGATGGCTCCTGCAGCACTTTTTCTTCTGAA AATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTTACT TAAAAATCAGTTTTGATGAAAGGAGGGAAAA GCAGATGGACTTGAAAAAGATCCAAGCTCCTA TTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAA TTTTTATAAACTAAAGTTGTACCTTTAATAT GTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGGTTCGCTCT TGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAAT GCTGCCTGCCTTTTGAGGCATTCAGTCCCTAG ACAATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCC AGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTC AGCTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAGG AGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTC CTTCTCTTTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCA AATTCCATCACATCACATTTAAATTGCAGACA GTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCA TAATATGCTTTTTACTCCCTGATCCCAGTTTCT GCTGTTGACTCTTCCATTCAGTTTTATTTATTGT GTGTTCTCACAGTGACACCATTTGTCCTTTTCT GCAACAACCTTTCCAGCTACTTTTGCCAAATTC TATTTGTCTTCTCCTTCAAACATTCTCCTTTGC AGTTCCTCTTCATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTC TCTTAACTTACCATTCCTATAGTACTTTATGCA TCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGC TCTTCTCCTTGATTTTAAAATTCCTTCTATAGCT AGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTTCTCCTGCA GTGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATA AGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTTAGAT TTATCACTTTTAAATAGGGTGAGCTTGAGAGTT TCCTTCTTTCTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTT

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p> TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGACTAATTCAC  ATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTT  CTCCTGGAAACTCCAGGTCCATTCTGTTTAAAT  CCCTAAGAATGTCAGAATTAATAACAGGGC  TATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGG  ATGCTATAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAA  ATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACAC  GATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAA  ATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTT  GCTTAAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCT  GTGGTGTATGTATGGAAACACATACTCCTTAA  TTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATT  GTCGGGCAACCGTTTATTTTTTATTGTATTTTAT  TTGGTTGAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTAC  TTGTGTCATATTTTAAAATTAATACTGCCATC  ACCTGCTGGGGTCCTTTGTTAGGTCATTTTCAG  TGAATAATAGGGATAATCCAGGTAACTTTGAA  GAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTC  TGCCTTTAGCTTTGACAGTTCTTAATTAAGATC  ATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTT  TTGAAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCC  TCTGTAAGACAACATCTTAAATCTTAAAAGTG  TTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACAT  TTTGTTTTTATTAAATGGAGCATTATTTACAAA  AAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCGT  ATAAATATCTATTAACCATTCTAAATAAAGAG  AACTCCAGTGTTGCTATGTGCAAGATCCTCTCT  TGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGC  TATTTGTCAGTAGCCATTTTTTTGCAGTGATTT  GAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACC  GTTAAAGGTTTTTTTTTTTTATATGTATTAATC  AATTTATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGC </p>

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		AATCTTTGCCAAGGTA CTTTTTTATTTAAAAA AAACATAACTTTGTAAATATTACCCTGTAATAT TATATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTATTT TGTTGGGCTATTTCTATTGCTGCTACAGCAGAC CACAAGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTA ATGTATTTTTAAGTTGCTTATATTCTAGGTAAC AATGTAAAGAATGATTTAAAATATTAATTATG AATTTTTTGAGTATAATACCCAATAAGCTTTTA ATTAGAGCAGAGTTTTAATTA AAAAGTTTTAAAT CAGTCCA A
Молекула CD47 (CD47) Homo sapiens, вариант транскрипта 2, мРНК NCBI Эталонная последовательность : NM_198793.3	6	GGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGGAAGCA GTGGGAGCGCGCGTGC GCGCGGCCGTGCAGCC TGGGCAGTGGGTCCTGCCTGTGACGCGCGGCG GCGGTCGGTCCTGCCTGTAACGGCGGGCGGCGG CTGCTGCTCCAGACACCTGCGGGCGGCGGCGGC GACCCCGCGGCGGGCGCGGAGATGTGGCCCCT GGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCT GCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACA AAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAAATGACACT GTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAG GCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTG GAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTG ATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACA ATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATGG ATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAAC TACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGA AGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTG TTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTC TTATTGTTATTTCCCAATTTTGCTATACTCCT GTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAAACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACT GTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTC CCAGGTGAATATTCATTAAGAATGCTACTGG CCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATT AATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGC GATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATT GGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCTCGCTGT GGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTAT ACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTCAGGTTT GAGTATCTTAGCTCTAGCACAACTTGGACT AGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAA GACTATAACAACCTCCTAGGAATAACTGAAGTG AAGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAG ACGTGAAAGGAATACACTTGTGTTAAGCACC ATGGCCTTGATGATTCAGTGTGGGGAGAAGA AACAAAGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAG ACCCTTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTTTATTC AAAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAATAATT ATGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAG TTTTTTGTTGTTATTTTTAATCAATTAGGGGCA ATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGC CTTTCAGGTCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTA ACCAGTTTAAATTGGTTCAGGGTGATAACTAC TTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATAT CTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCTTT GCCAACTCAGGTTACAGCAGCTTTGGGCAGT TATGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCT GCCACTTCTGGGTCAATGGAATAATAAATTAA GTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTG TATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAG ATAGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTTGCCATTCC CACATTCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGG

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		TCCTTCCCAGATTTAGGGTACTTTTATTGATGG ATATGTTTTCTTTTATTCACATAACCCCTTGA AACCTGTCTTGTCCCTCCTGTTACTTGCTTCTG CTGTACAAGATGTAGCACCTTTTCTCCTCTTTG AACATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTTG CAGGAAGGAGCCAGACTTGTTCAGAGCACT GTGTTACACTTTTCAGCAAAAATAGCTATGGT TGTAACATATGTATTCCCTTCCTCTGATTTGAA GGCAAAAATCTACAGTGTTTCTTCACTTCTTTT CTGATCTGGGGCATGAAAAAGCAAGATTGAA ATTTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACAA AATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGC CCTTGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTAT GTTGCATGATAAACATTCATCACCTTCCTCCTG TAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCTATGAT TGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCTATCC TGGTTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTTG TGATCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCAT TCGTTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTA TGTGCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCT TCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGA GAGCAAAGGTTAATTTTGTGCTTTTAGTAAAA ACATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGTGGA ATTATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAA ACTTTTAAACTTCTAGGTAATTTGCCACGCTT TTTGACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATAC GTAATTCTTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCA TATTTGTAGTTGCATTAATAATAGTTATTTCTT AGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTAT GCCAAATTGATTGTCATATTTTCATGTTGGGACC AAGTAGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATTTAT GACCTGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCAT

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		АСТАGСАAGACAGCTCTTCTTGAAAAAAAAAA ТATGTATACACAAATATATACGTATATCTATAT ATACGTATGTATATACACACATGTATATTCTTC CTTGATTGTGTAGCTGTCCAAAATAATAACAT ATATAGAGGGAGCTGTATTCCTTTATACAAAT CTGATGGCTCCTGCAGCACTTTTTCTTCTGAA AATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTACT ТТАAAAATCAGTTTTGATGAAAGGAGGGAAAA GCAGATGGACTTGAAAAAGATCCAAGCTCCTA ТTAGAAAAGGTATGAAAATCTTTATAGTAAAA ТTTTTTATAAACTAAAGTTGTACCTTTAATAT GTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGGTTCGCTCT TGGATCTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAAT GCTGCCTGCCTTTTGAGGCATTCCTGCCCCTAG АСАATGCCACCAGAGATAGTGGGGGAAATGCC AGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGTC AGCTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAGG AGTCCTCCTGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTC CTTCTCTTTAAATCAGATTTGTAATGGCTCCCA AATTCCATCACATCACATTTAAATTGCAGACA GTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCA ТААТАTGCTTTTTACTCCCTGATCCCAGTTTCT GCTGTTGACTCTTCCATTCAGTTTTATTTATTGT GTGTTCTCACAGTGACACCATTTGTCCTTTTCT GCAACAACCTTTCCAGCTACTTTTGCCAAATTC ТАТТТGTCTTCTCCTTCAAACATTCTCCTTTGC AGTTCCTCTTCATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTC TCTTAACTTACCATTCCCTATAGTACTTTATGCA TCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTTTGGCCTTGC TCTTCTCCTTGATTTTAAAATTCCTTCTATAGCT АGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTTCTCCTGCA GTGTTTTGCATACATCAGAAGCTAGGTACATA

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		AGTTAAATGATTGAGAGTTGGCTGTATTTAGAT TTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTGAGAGTT TTCTTTCTTTCTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTAATTCAC ATGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTT CTCCTGGAAACTCCAGGTCCATTCTGTTTAAAT CCCTAAGAATGTCAGAATTAATAACAGGGC TATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGG ATGCTATAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAA ATTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAACAC GATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAA ATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTT GTCTTAAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCT GTGGTGTATGTATGGAAACACATACTCCTTAA TTTACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATT GTCGGGCAACCGTTTATTTTTTATTGTATTTTAT TTGGTTGAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTAC TTGTGTCATATTTTAAAATTAATAACTGCCATC ACCTGCTGGGGTCCTTTGTTAGGTCATTTTCAG TACTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTTGAA GAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTC TGCCTTTAGCTTTGACAGTTCTTAATTAAGATC ATTGAAGACCAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTT TTGAAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCC TCTGTAAGACAACATCTTAAATCTTAAAAGTG TTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACAT TTTGTTTTTATTAATGGAGCATTATTTACAAA AAGCCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCGT ATAAATATCTATTAACCATTCTAAATAAAGAG AACTCCAGTGTTGCTATGTGCAAGATCCTCTCT TGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGC TATTTGTCAGTAGCCATTTTTTTGCAGTGATT

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		GAAGACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACC GTTAAAGGTTTTTTTTTTTATATGTATTAATC AATTTATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGC AATCTTTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAAAA AAACATAACTTTGTAAATATTACCCTGTAATAT TATATATACTTAATAAAACATTTTAAGCTATTT TGTGGGCTATTTCTATTGCTGCTACAGCAGAC CACAAGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTA ATGTATTTTTAAGTTGCTTATATTCTAGGTAAC AATGTAAAGAATGATTTAAAATATTAATTATG AATTTTTTGAGTATAATACCCAATAAGCTTTTA ATTAGAGCAGAGTTTTAATTAAGTTTTAAAT CAGTC
СПРОГНОЗИРОВА НО: Молекула CD47 (CD47) Homo sapiens, вариант транскрипта X11  NCBI Эталонная последовательность : XM_005247909.2	7	GTGCGCGCGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGT CCTGCCTGTGACGCGCGGCGGCGGTTCGGTCCT GCCTGTAACGGCGGCGGCGGCTGCTGCTCCGG ACACCTGCGGCGGCGGCGGCGACCCCGCGGCG GCGCGGAGATGTGGCCCTGGTAGCGGCGCT GTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGCTC AGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAA TTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCA TGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACAC TACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAG GAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTA AACAAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGT GCAAAAATTGAAGTCTCACAATTAATAAAAGG AGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATG CTGTCTCACACACAGGAACTACACTTGTGAA GTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGA TCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGT TTTCTCCAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTT CCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACA

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		GTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGATCCG GTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTACTT GTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATT GTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATAT TCATTAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATT GTGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTG ATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGT CTCTGTATTGCGGCGTGTATAACCAATGCATGGC CCTCTTCTGATTTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCT CTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAA ATTTGTGGAATAACTGAAGTGAAGTGATGGAC TCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACGTGAAAGGA ATACACTTGTGTTTAAGCACCATGGCCTTGATG ATTCACTGTTGGGGAGAAGAAACAAGAAAAGT AACTGGTTGTCACCTATGAGACCCTTACGTGAT TGTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTAA TTTAGTTAATAAAATAATTATGATCTATGTTGT TTGCCAATTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTAT TTTTAATCAATTAGGGGCAATAGTAGAATGGA CAATTTCCAAGAATGATGCCTTTCAGGTCCTAG GGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTG GTTCAGGGTGATAACTACTTAGCACTGCCCTG GTGATTACCCAGAGATATCTATGAAAACCAGT GGCTTCCATCAAACCTTTGCCAACTCAGGTTCA CAGCAGCTTTGGGCAGTTATGGCAGTATGGCA TTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCA ATGGAATAATAAATTAAGTACAGGCAGGAATT TGGTTGGGAGCATCTTGTATGATCTCCGTATGA TGTGATATTGATGGAGATAGTGGTCCTCATTCT TGGGGGTTGCCATTCCCACATTCCCCCTTCAAC

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		AAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTTAGG GTA CTTTTATTGATGGATATGTTTTCTTTTTATT CACATAACCCCTTGAAACCCTGTCTTGTCTCC TGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAGATGTAGCAC CTTTTCTCCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACAC GGTAGCACCAGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTT GTTCTCAGAGCACTGTGTTACACTTTTCAGCA AAAATAGCTATGGTTGTAACATATGTATTCCT TCCTCTGATTTGAAGGCAAAAATCTACAGTGTT TCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAA AAGCAAGATTGAAATTTGAACTATGAGTCTCC TGCATGGCAACAAAATGTGTGTCACCATCAGG CCAACAGGCCAGCCCTTGAATGGGGATTTATT ACTGTTGTATCTATGTTGCATGATAAACATTCA TCACCTTCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCC CCTTCCCCTATGATTGAAAAGTAAACAAAACC CACATTCCTATCCTGGTTAGAAGAAAATTAAT GTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGGAGTACTTTT AGACTTTTAGCATTTCGTTTTTTACCTGTTTGTG GATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATA GGCACATGCATCTTCTGTATGGACAAAGGTGG GGTACCTACAGGAGAGCAAAGGTTAATTTTGT GCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAAAGTTCT TTATTGGGTGGAATTATATTTGATGCAAATATT TGATCACTTAAAAC TTTTAAAAC TTTCTAGGTAA TTTGCCACGCTTTTTGACTGCTCACCAATACCC TGTA AAAATACGTAATTCTTCCTGTTTGTGTAA TAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAATAAT AGTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGT GCCTCTTTTATGCCAAATTGATTGTCATATTC ATGTTGGGACCAAGTAGTTTGCCCATGGCAAA CCTAAATTTATGACCTGCTGAGGCCCTCTCAGA

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		AAACTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCTT GAAAAAAAAAATATGTATACACAAATATATAC GTATATCTATATATACGTATGTATATACACACA TGTATATTCTTCCTTGATTGTGTAGCTGTCCAA AATAATAACATATATAGAGGGAGCTGTATTCC TTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCAGCACTTT TTCCTTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCT AGTTTGTTACTTTAAAAATCAGTTTTGATGAAA GGAGGGAAAAGCAGATGGACTTGAAAAAGAT CCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAATCT TTATAGTAAAATTTTTTATAAACTAAAGTTGTA CCTTTTAATATGTAGTAAACTCTCATTTATTTG GGGTTTCGCTCTTGGATCTCATCCATCCATTGTG TTCTCTTTAATGCTGCCTGCCTTTTGAGGCATT CACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTG GGGGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTTGCTC TCACTAGTTGTCAGCTTCTCTGGATAAGTGACC ACAGAAGCAGGAGTCCTCCTGCTTGGGCATCA TTGGGCCAGTTCCTTCTCTTTAAATCAGATTTG TAATGGCTCCCAAATTCCATCACATCACATTTA AATTGCAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCT GTTTTGTCCATAATATGCTTTTTACTCCCTGA TCCCAGTTTCTGCTGTTGACTCTTCCATTCAGT TTTATTTATTGTGTGTTCTCACAGTGACACCAT TTGTCCTTTTCTGCAACAACCTTTCCAGCTACT TTTGCCAAATTCTATTTGTCTTCTCCTTCAAAA CATTCTCCTTTGCAGTTCCCTTTCATCTGTGTA GCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATTCCCTAT AGTACTTTATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAG TTTTTTGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATTTAAAA TTCCTTCTATAGCTAGAGCTTTTCTTTCTTTCAT TCTCTTTCCTGCAGTGTTTTGCATACATCAGA

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		AGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGTT GGCTGTATTTAGATTTATCACTTTTTAATAGGG TGAGCTTGAGAGTTTTCTTTCTTTCTGTTTTTTT TTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTGACTAATTTACATGCTCTAAAAACCTTCAA AGGTGATTATTTTTCTCCTGGAACTCCAGGTC CATTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATT AAAATAACAGGGCTATCCCGTAATTGGAAATA TTTCTTTTTTCAGGATGCTATAGTCAATTTAGT AAGTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTAACA AAGCTCAAAACACGATAAGTTTACTCCTCCAT CTCAGTAATAAAAATTAAGCTGTAATCAACCT TCTAGGTTTCTCTTGTCTTAAAATGGGTATTCA AAAATGGGGATCTGTGGTGTATGTATGGAAAC ACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAACT GGAGAAATGATTGTCGGGCAACCGTTTATTTTT TATTGTATTTTATTTGGTTGAGGGATTTTTTTAT AAACAGTTTTACTTGTGTCATATTTAAAATTA CTAACTGCCATCACCTGCTGGGGTCCTTTGTTA GGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCA GGTAACTTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACC AGGCAGTTTTTCTGCCTTTAGCTTTGACAGTTC TTAATTAAGATCATTGAAGACCAGCTTTCTCAT AAATTTCTCTTTTTGAAAAAAGAAAGCATT GTAATAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAA ATCTTAAAAGTGTTGTTATCATGACTGGTGAG AGAAGAAAACATTTTGTTTTTATTAATGGAG CATTATTTACAAAAGCCATTGTTGAGAATTA GATCCCACATCGTATAAATATCTATTAACCATT CTAAATAAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGTG CAAGATCCTCTCTTGGAGCTTTTTTGCATAGCA ATTAAAGGTGTGCTATTTGTCAGTAGCCATTTT

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		TTTGCAGTGATTTGAAGACCAAAGTTGTTTTAC AGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTTAT ATGTATTAATCAATTTATCACTGTTTAAAGCT TTGAATATCTGCAATCTTTGCCAAGGTACTTTT TTATTTAAAAAAAACATAACTTTGTAAATATT ACCCTGTAATATTATATACTTAATAAAACAT TTTAAGCTA
Молекула CD47 (CD47) Homo sapiens, вариант транскрипта 3  NCBI Эталонная последовательность : NM_001382306.1	8	GCAGCCTGGGCAGTGGGTCCTGCCTGTGACGC GCGGCGGCGGTCGGTCCTGCCTGTAACGGCGG CGGCGGCTGCTGCTCCGGACACCTGCGGCGGC GGCGGCGACCCCGCGGCGGGCGCGGAGATGT GGCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCG GCGTGCTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAAT AAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAA TGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAA TATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACG TAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTAC ACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGT CCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAG TCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTG AAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACAC AGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTA CCAGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAA ATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGA AAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCT AACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAA ACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGA GAAAACAATTGCTTTACTTGTGCTGGACTAGT GATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCT TTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAGAATGC TACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAG

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p>TACAGCGATTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGC  CATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTATATCCT  CGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGC  GTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTT  AGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAACTACT  TGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGCTTCCAA  TCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTG  TAGAGGAACCCCTTAATGAATAACTGAAGTGA  AGTGATGGACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGA  CGTGAAAGGAATACACTTGTGTTTAAGCACCA  TGGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGAGAAGAA  ACAAGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGA  CCCTTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTTTATTCA  AAGCAGCTGTAATTTAGTTAATAAAATAATTA  TGATCTATGTTGTTTGCCCAATTGAGATCCAGT  TTTTTGTTGTTATTTTTAATCAATTAGGGGCAA  TAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCC  TTTCAGGTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAA  CCAGTTTAAATTGGTTCAGGGTGATAACTACTT  AGCACTGCCCTGGTGATTACCCAGAGATATCT  ATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCTTTGC  CAACTCAGGTTACACAGCAGCTTTGGGCAGTTA  TGGCAGTATGGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGC  CACTTCTGGGTCAATGGAATAATAAATTAAGT  ACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATCTTGTA  TGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAGAT  AGTGGTCCTCATTCTTGGGGGTTGCCATTCCCA  CATCCCCCTTCAACAAACAGTGTAACAGGTC  CTTCCCAGATTTAGGGTACTTTTTATTGATGGAT  ATGTTTTCTTTTTATTACATAACCCCTTGAAA  CCCTGTCTTGTCTCCTGTTACTTGCTTCTGCTG  TACAAGATGTAGCACCTTTTCTCCTCTTTGAAC</p>

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		<p>           ATGGTCTAGTGACACGGTAGCACCAGTTGCAG            GAAGGAGCCAGACTTGTTCTCAGAGCACTGTG            TTCACACTTTTCAGCAAAAATAGCTATGGTTGT            AACATATGTATTCCCTTCCTCTGATTTGAAGGC            AAAAATCTACAGTGTTTCTTCACTTCTTTTCTG            ATCTGGGGCATGAAAAAAGCAAGATTGAAATT            TGAACATGAGTCTCCTGCATGGCAACAAAAT            GTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCCT            TGAATGGGGATTTATTACTGTTGTATCTATGTT            GCATGATAAACATTCATCACCTTCCTCCTGTAG            TCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCCCTATGATTGA            AAAGTAAACAAAACCCACATTTCCCTATCCTGG            TTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTTGTGA            TCGCCTGGAGTACTTTTAGACTTTTAGCATTG            TTTTTTACCTGTTTGTGGATGTGTGTTTGTATGT            GCATACGTATGAGATAGGCACATGCATCTTCT            GTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGA            GCAAAGGTTAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAAC            ATTTAAATACAAAGTTCTTTATTGGGTGGAATT            ATATTTGATGCAAATATTTGATCACTTAAAAC            TTAAAACCTCTAGGTAATTTGCCACGCTTTTT            GACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTA            ATTCTTCCTGTTTGTGTAATAAGATATTCATAT            TTGTAGTTGCATTAATAATAGTTATTTCTTAGT            CCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCTTTTATGCC            AAATTGATTGTCATATTTTCATGTTGGGACCAAG            TAGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATTTATGACC            TGCTGAGGCCTCTCAGAAAACCTGAGCATACTA            GCAAGACAGCTCTTCTTGAAAAAAAATATG            TATACACAAATATATACGTATATCTATATATAC            GTATGTATATACACACATGTATATTCTTCCTTG            ATTGTGTAGCTGTCCAAAATAATAACATATAT         </p>



Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		TGCTCTAAAAACCTTCAAAGGTGATTATTTTTC TCCTGGAAACTCCAGGTCCATTCTGTTTAAATC CCTAAGAATGTCAGAATTAATAACAGGGCT ATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGGA TGCTATAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAA TTGTTATTTGCACTAACAAAGCTCAAAACACG ATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGTAATAAAAAT TAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTTGT CTTAAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGT GGTGTATGTATGGAAACACATACTCCTTAATTT ACCTGTTGTTGGAAACTGGAGAAATGATTGTC GGGCAACCGTTTATTTTTTATTGTATTTTATTG GTTGAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTACTTG TGTCATATTTTAAAATTAATACTGCCATCACC TGCTGGGGTCCTTTGTTAGGTCATTTTCAGTGA CTAATAGGGATAATCCAGGTAACCTTGAAGAG ATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTCTGC CTTTAGCTTTGACAGTTCTTAATTAAGATCATT GAAGACCAGCTTCTCATAAATTTCTCTTTTTG AAAAAAGAAAGCATTGTACTAAGCTCCTCT GTAAGACAACATCTTAAATCTTAAAAGTGTTG TTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTT GTTTTTATTAATGGAGCATTATTTACAAAAG CCATTGTTGAGAATTAGATCCCACATCGTATA AATATCTATTAACCATTCTAAATAAAGAGAAC TCCAGTGTTGCTATGTGCAAGATCCTCTCTTGG AGCTTTTTTGCATAGCAATTAAGGTGTGCTAT TTGTCAGTAGCCATTTTTTGCAGTGATTTGAA GACCAAAGTTGTTTTACAGCTGTGTTACCGTTA AAGGTTTTTTTTTTATATGTATTAATCAATTT ATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATCT TTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAAAAAACA

Наименование	SEQ ID NO:	Последовательность
		TAACTTTGTAATATTACCCTGTAATATTATAT AТАCTTAATAAAACATTTTAAGCTATTTTGTTG GGCTATTTCTATTGCTGCTACAGCAGACCACA AGCACATTTCTGAAAAATTTAATTTATTAATGT ATTTTAAAGTTGCTTATATTCTAGGTAACAATG TAAAGAATGATTTAAAATATTAATTATGAATTT TTTGAGTATAATACCCAATAAGCTTTTAATTAG AGCAGAGTTTTAATTAAGTTTTAAATCAGT CCAA
предшественник изоформы 4 поверхностного антигена CD47 лейкоцитов [Mus 9 musculus] NCBI Эталонная последовательность : NP_034711.1		MWPLAAALLGSCCGSAQLLFSNVNSIEFTSCN ETVVIPCIVRNVEAQSTEEMFVKWKLNKSIFY DGNKNSTTTDQNFTSAKISVSDLINGIASLKMDK RDAMVGNYTCEVTELSREGKTVIELKNRTAFNT DQGSACSYEEEEKGGCKLVSWFSPNEKILIVIFPIL AILLFWGKFGILTLKYKSSHTNKRIILLVAGLVL TVIVVVGAILLIPGEKPKNASGLGLIVISTGILILL QYNVFMATAFGMTSFTIAILITQVLGYVLALVGLC LCIMACEPVHGPLLISGLGIIALAEGLLVYMKFV ASNQRTIQPPNR

## 9. Примеры

[00127] Примеры в этом разделе (т. е. разделе 7) предложены в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

### 9.1 Пример 1: Кросс-дрессинг свиных LCL и клеток Jurkat человека трансгенным hCD47 после совместного культивирования с клетками LCL hCD47-Tg.

[00128] Этот пример демонстрирует, что гетерологичный человеческий CD47 может успешно экспрессироваться в клеточной линии, не экспрессирующей CD47 человека, после совместного культивирования.

[00129] Чтобы определить, может ли CD47 человека переноситься из одной клетки в другую с помощью EV, клетки родительской линии клеток В-лимфомы свиньи (LCL), которые не экспрессировали CD47 человека (hCD47), культивировали совместно с клетками LCL, которые трансгенно экспрессируют hCD47. Как показано на Фиг. 1А и Фиг. 2, родительская клеточная линия LCL свиньи не экспрессировала hCD47, что было

измерено с помощью FACS (Фиг. 1А, Фиг. 2 и Таблица 2). Напротив, клетки LCL свиньи, экспрессирующие трансгенный человеческий CD47 (клетки LCL hCD47-Tg), экспрессировали высокие уровни CD47 (Фиг. 1В, Фиг. 2 и Таблица 2). Примечательно, что обнаружение huCD47 в родительской клеточной линии LCL после совместного культивирования с клетками LCL hCD47-Tg показало сильное увеличение экспрессии hCD47 (Фиг. 1С, Фиг. 2 и Таблица 2).

**Таблица 2: Результаты экспрессии hCD47 в клетках LC согласно FACS**

	<b>hCD47 отрицательные (%)</b>	<b>hCD47 + (%)</b>	<b>Высок. hCD47+ (%)</b>
клетки LCL	98	2,04	0
hCD47-Tg клетки LCL	0,010	0,34	99,6
клетки LCL + hCD47-Tg клетки LCL, совместная культура	14,8	37,8	47,5
CD47 KO Jurkat клетки	99,5	0,49	0
CD47 KO Jurkat + hCD47-Tg клетки LCL, совместная культура	39,7	16,8	43,4

**[00130]** Аналогичные результаты наблюдались при использовании клеток Jurkat T-клеточного лейкоза человека, в которых CD47 был нокаутирован посредством CRISPR-Cas9, и культивировались такие клетки совместно с клетками LCL hCD47-Tg. Вкратце, клетки Jurkat, нокаутные по CD47 (KO), культивировали совместно с клетками LCL hCD47-Tg и экспрессию hCD47 измеряли с помощью FACS. Как показано на Фиг. 3В, совместное культивирование приводило к сильному увеличению экспрессии hCD47 в клетках CD47KO Jurkat (Фиг. 3В и Таблица 2).

**[00131]** Эти данные показали, что свиные клетки могут быть кросс-дрессенгированы посредством человеческого CD47 путем совместного культивирования с клетками, экспрессирующими человеческий CD47.

**9.2 Пример 2: Кросс-дрессинг свиных LCL и клеток Jurkat, нокаутных по hCD47, посредством нативного hCD47 после совместного культивирования с**

**клетками Jurkat дикого типа.**

[00132] Этот пример демонстрирует, что кросс-дрессинг hCD47 из одной клеточной линии в другую после совместного культивирования было воспроизводимо в дополнительных типовых моделях клеточных линий.

[00133] Вкратце, клетки, нокаутные по CD47 (КО), культивировали совместно с родительскими клетками Jurkat (дикого типа, WT) или свиными клетками LCL в течение 24 часов и анализировали на предмет кросс-дрессинга hCD47 на гейтированных клетках CD47КО Jurkat с помощью FACS с использованием mAb против hCD47-BV786. Клетки, культивированные отдельно, использовали в качестве контроля окрашивания, которые либо окрашивали отдельно, либо смешивали непосредственно перед окрашиванием. Показаны репрезентативные гистограммы (цифры на фигуре указывают среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) гейтированных клеток CD47КО Jurkat).

[00134] Как показано на Фиг. 4А, уровни человеческого CD47, определенные с помощью FACS, в клетках CD47КО Jurkat были почти полностью неопределяемыми по сравнению с клетками Jurkat дикого типа (WT) (Фиг. 4 и Фиг. 4В соответственно; Фиг. 6 и Таблица 3). После совместного культивирования клеток CD47КО Jurkat с клетками WT Jurkat в клетках CD47КО Jurkat наблюдалось сильное увеличение hCD47 (Фиг. 4С, Фиг. 6 и Таблица 3).

**Таблица 3: Результаты экспрессии hCD47 в клетках CD47КО Jurkat и клетках LCL согласно FACS**

	hCD47 отрицательные (%)	hCD47 положительные (%)	Высок. hCD47 положительные (%)
CD47 КО Jurkat	99,5	0,49	0
WT Jurkat	0	1,12	98,9
CD47 КО Jurkat + WT Jurkat (совместная культура)	34,8	23,1	42,3
Свиные LCL	98,0	2,04	0
Свиные LCL + WT Jurkat (совместная культура)	6,82	47,4	45,7

[00135] Аналогичные результаты наблюдались при совместном культивировании свиных клеток LCL с клетками WT Jurkat. Как показано на Фиг. 5А-5В, совместное культивирование свиных клеток LCL с клетками Jurkat дикого типа приводило к сильному увеличению экспрессии hCD47 по сравнению с не культивируемыми совместно свиными клетками LCL (Фиг. 5А и Фиг. 5В, соответственно, и Таблица 3).

[00136] Эти результаты показали, что кросс-дрессинг посредством человеческого CD47 также может происходить на клетках человека и может быть индуцирован не только трансгенными hCD47 клетками, но также клетками, которые экспрессируют только нативный CD47.

**9.3 Пример 3: Кросс-дрессинг клеток CD47KO Jurkat посредством CD47 с помощью внеклеточных везикул или экзосом из клеток WT Jurkat.**

[00137] Этот пример демонстрирует, что выделенные EV из клеток, экспрессирующих CD47, можно использовать для кросс-дрессинга клеток, которые не экспрессируют CD47.

[00138] Вкратце, MV и экзосомы выделяли из супернатантов, собранных из клеток WT Jurkat, культивированных в FBS, деплетированном 10% экзосомами. Внеклеточные везикулы (EV) и экзосомы (Exos) из супернатантов клеточных культур очищали с помощью стандартного протокола дифференциального центрифугирования. Супернатанты, собранные из 48-часовых клеточных культур, центрифугировали при 2000 g (3000 об/мин) в течение 20 минут для удаления клеточного дебриса и мертвых клеток. Внеклеточные везикулы осаждали после центрифугирования при 16500 g (9800 об/мин) в течение 45 минут (Beckman Coulter, Optima XE-90) и ресуспендировали в PBS. Осажденные экзосомы из супернатантов дополнительно центрифугировали при 100 000 g (26 450 об/мин) в течение 2 часов при 4 °C (Beckman Coulter, Optima XE-90) и ресуспендировали в PBS.

[00139] Выделенные MV и экзосомы впоследствии совместно культивировали с клетками Jurkat, в которых CD47 был нокаутирован (клетки CD47 KO Jurkat) в течение 2 или 6 часов. Как показано на Фиг. 7C, совместное культивирование в течение 2 часов с MV приводило к увеличению экспрессии CD47 в клетках CD47 KO Jurkat (Фиг. 7C и Таблица 4). После 6 часов совместного культивирования с MV или экзосомами, экспрессия CD47 повышалась в клетках CD47 KO Jurkat (Фиг. 8C и Фиг. 8D соответственно, а также Таблица 4).

**Таблица 4: Результаты экспрессии hCD47 в клетках CD47KO Jurkat согласно FACS**

	<b>hCD47 отрицательные (%)</b>	<b>hCD47 положительные (%)</b>
CD47 KO Jurkat клетки	99,2	0,84
WT Jurkat клетки	0,041	100
CD47 KO Jurkat клетки + Jurkat WT MV (2 часа)	89,1	10,9
CD47 KO Jurkat клетки + Jurkat WT	99,2	0,77

	<b>hCD47 отрицательные (%)</b>	<b>hCD47 положительные (%)</b>
экзосомы (2 часа)		
CD47 KO Jurkat клетки	99,4	0,60
WT Jurkat клетки	0,094	99,9
CD47 KO Jurkat клетки + Jurkat WT MV (6 часов)	83,0	17
CD47 KO Jurkat клетки + Jurkat WT экзосомы (6 часов)	98,6	1,36

[00140] Эти данные указывают на то, что EV (например, MV или экзосомы) из клеток, экспрессирующих hCD47, можно использовать для кросс-дрессинга клеток, которые не экспрессируют hCD47.

#### **9.4 Пример 4: Кросс-дрессинг свиных клеток LCL посредством CD47 с помощью внеклеточных везикул или экзосом из клеток WT Jurkat**

[00141] В этом примере продемонстрировано, что свиные клетки могут быть кросс-дрессингованы посредством hCD47 из человеческих клеток после совместного культивирования.

[00142] Вкратце, MV и экзосомы выделяли из клеток WT Jurkat, как описано выше. Выделенные MV и экзосомы впоследствии совместно культивировали со свиными клетками LCL, которые не экспрессируют hCD47, в течение 2 или 6 часов. Как показано на Фиг. 9C, совместное культивирование в течение 2 часов с MV приводило к увеличению экспрессии CD47 в свиных клетках LCL (Фиг. 9C и Таблица 5). После 6 часов совместного культивирования с MV или экзосомами, экспрессия CD47 повышалась в свиных клетках LCL (Фиг. 10C и Фиг. 10D соответственно, а также Таблица 5).

**Таблица 5: Результаты экспрессии hCD47 в свиных клетках LCL согласно FACS**

	<b>hCD47 отрицательные (%)</b>	<b>hCD47 положительные (%)</b>
Свиные клетки LCL	98,1	1,89
hCD47-Tg клетки LCL	0,27	99,7
Свиные клетки LCL + Jurkat WT MV (2 часа)	88,6	11,4
Свиные клетки LCL + Jurkat WT экзосомы (2 часа)	98	1,99

	<b>hCD47 отрицательные</b> <b>(%)</b>	<b>hCD47 положительные</b> <b>(%)</b>
Свиные клетки LCL	98,3	1,70
hCD47-Tg клетки LCL	0,098	99,9
Свиные клетки LCL + Jurkat WT MV (6 часов)	82,6	17,4
Свиные клетки LCL + Jurkat WT экзосомы (6 часов)	97,8	2,20

**[00143]** Эти данные свидетельствуют о том, что свиные клетки LCL (экспрессирующие свиной CD47) могут быть кросс-дрессингированы человеческим CD47 при воздействии EV или экзосом, выделенных из человеческих клеток Jurkat дикого типа.

## **10. Эквиваленты**

**[00144]** Хотя изобретение подробно описано со ссылкой на его конкретные варианты осуществления, следует понимать, что варианты, которые функционально эквивалентны, входят в объем настоящего изобретения. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к продемонстрированным или описанным в данном документе станут очевидными для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и сопроводительных графических материалов. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Специалистам в данной области техники станет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Такие эквиваленты должны охватываться следующей формулой изобретения.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

**Формула изобретения**

1. Способ ксенотрансплантации, включающий
  - a. получение органа от свиньи-донора;
  - b. кросс-дрессинг органа посредством человеческого CD47; и
  - c. трансплантацию органа человеку-реципиенту.
2. Способ по пункту 1, в котором этап кросс-дрессинга включает воздействие на орган человеческими внеклеточными везикулами (EV), содержащими CD47.
3. Способ по 2, в котором EV выделяют из клеток человека.
4. Способ по п. 3, в котором клетки экспрессируют рекомбинантный человеческий CD47.
5. Способ по п. 3 или п. 4, в котором клетки представляют собой трансгенные клетки.
6. Способ по любому из пп. 2 - 5, в котором кросс-дрессинг достигается путем инкубации органа с EV, экспрессирующими человеческий CD47, в течение 2 часов.
7. Способ по любому из пп. 2 - 5, в котором кросс-дрессинг достигается путем инкубации органа с EV, экспрессирующими человеческий CD47, в течение 6 часов.
8. Способ по любому из пп. 2 - 5, в котором кросс-дрессинг достигается путем перфузии органа *ex vivo*.
9. Способ по любому из пп. 2 - 5, в котором кросс-дрессинг достигается путем перфузии *in vivo* свиньи-донора, человека-реципиента или их комбинации.
10. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза макрофагами человека.
11. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 5% до около 25% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.
12. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 25% до около 50% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.
13. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 50% до около 75% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа,

что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

14. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 75% до около 80% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

15. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 80% до около 85% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

16. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 85% до около 90% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

17. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к снижению фагоцитоза клеток кросс-дрессингированного органа человеческими макрофагами на от около 90% до около 95% по сравнению с клетками не кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

18. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ не приводит к обнаружению фагоцитоза кросс-дрессингированного органа, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

19. Способ по любому из пп. 1 - 9, причем способ приводит к повышению жизнеспособности органа за счет защиты от человеческих макрофагов, что измерено с помощью FACS-анализа процентного содержания CD14-положительных клеток, поглощающих кросс-дрессингированные клетки.

20. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором кросс-дрессингированный орган избегает фагоцитоза без индукции апоптоза.

21. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором кросс-дрессингированный орган избегает фагоцитоза и не демонстрирует какого-либо обнаруживаемого уровня апоптоза.

22. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-

дрессингированного органа, демонстрируют на от около 5% до около 25% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

23. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют на от около 25% до около 50% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

24. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют на от около 50% до около 75% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

25. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют на от около 75% до около 80% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

26. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют на от около 80% до около 85% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

27. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют на от около 85% до около 90% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

28. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором клетки, полученные из кросс-дрессингированного органа, демонстрируют меньшей мере на 90% более низкие уровни апоптоза по сравнению с клетками, полученными из не кросс-дрессингированного органа.

29. Способ по любому из пп. 20 - 28, в котором апоптоз измеряют с помощью окрашивания пропидия йодом.

30. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

31. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на от около 5% до около 25% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

32. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе

наблюдается уменьшение воспаления на от около 25% до около 50% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

33. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на от около 50% до около 75% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

34. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на от около 75% до около 80% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

35. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на от около 80% до около 85% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

36. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на от около 85% до около 90% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

37. Способ по любому из пп. 1 - 29, в котором в кросс-дрессингированном органе наблюдается уменьшение воспаления на по меньшей мере 90% по сравнению с не кросс-дрессингированным органом.

38. Способ по любому из пп. 1 - 37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

39. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на от около 5% до около 25% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

40. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на от около 25% до около 50% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

41. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на от около 50% до около 75% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

42. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на от около 75% до около 80% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

43. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на от около 80% до около 85% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.

44. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на от около 85% до около 90% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.
45. Способ по любому из пп. 1-37, в котором у человека-реципиента наблюдается снижение системного воспаления после трансплантации на по меньшей мере 90% по сравнению с трансплантацией не кросс-дрессингированного органа.
46. Способ по любому из пп. 1-45, в котором орган представляет собой почку.
47. Способ по любому из пп. 1-45, в котором орган представляет собой легкое.
48. Способ по п. 46, в котором человек-реципиент страдает почечной недостаточностью.
49. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
50. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 10-20% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
51. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 20-30% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
52. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 30-40% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
53. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 40-50% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
54. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 50-60% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
55. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 60-70% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
56. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на 70-80% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.
57. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на

80-90% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.

58. Способ по любому из пп. 1-48, в котором человеку-реципиенту требуется на по меньшей мере 90% меньше иммуносупрессивной терапии, чем при стандартном лечении в сопоставимых клинических условиях.

59. Способ по любому из пп. 1-48, причем способ приводит к снижению протеинурии.

60. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия снижается до менее чем 3 г за 24 часа.

61. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия снижается до 500 мг за 24 часа.

62. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия снижается до 300 мг за 24 часа.

63. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия снижается до 150 мг за 24 часа.

64. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия устраняется в течение двух недель после трансплантации.

65. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия устраняется в течение одного месяца после трансплантации.

66. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия устраняется в течение двух месяцев после трансплантации.

67. Способ по любому из пп. 1-48, в котором протеинурия устраняется в течение четырех месяцев после трансплантации.

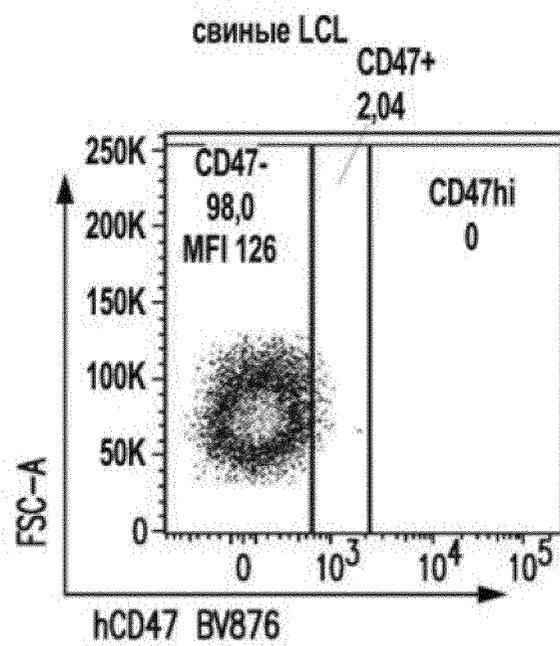
68. Способ по любому из пп. 1-67, дополнительно включающий трансплантацию ткани костного мозга реципиенту.

69. Способ по п. 68, в котором костный мозг берут от той же свиньи, что и почку.

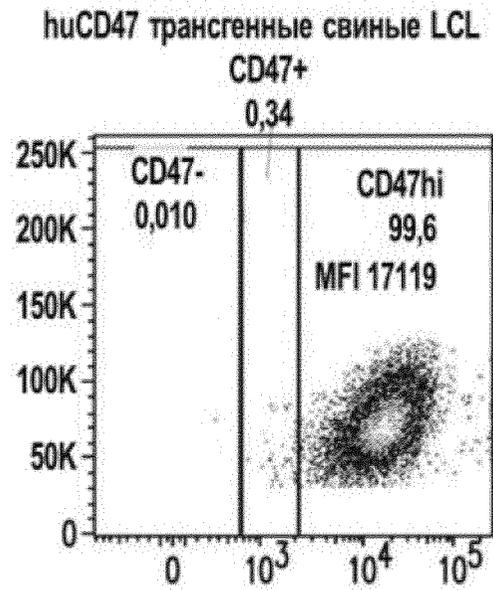
70. Способ по п. 68, в котором костный мозг берут не от той свиньи, от которой берут почку.

71. Способ по п. 68, в котором костный мозг подвергается кросс-дрессингу человеческим CD47 путем воздействия EV.

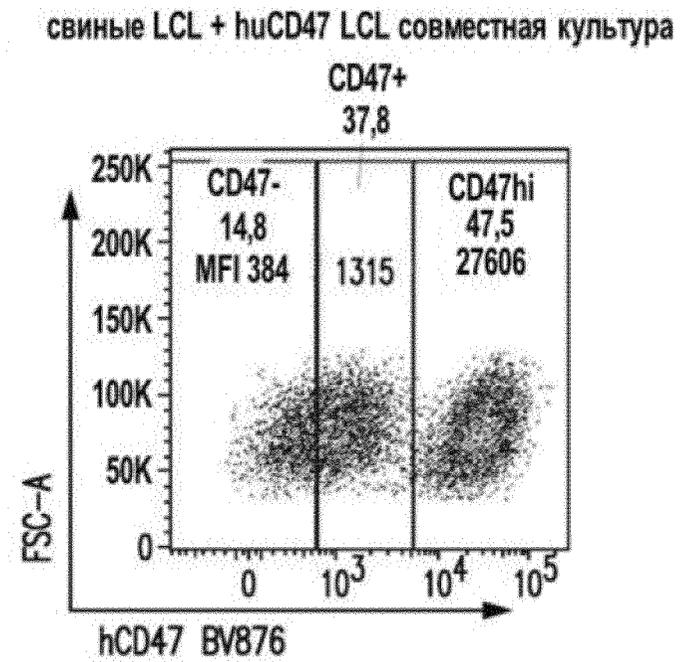
72. Способ по любому из пп. 1-71, в котором орган не экспрессирует человеческий SIRP $\alpha$ .



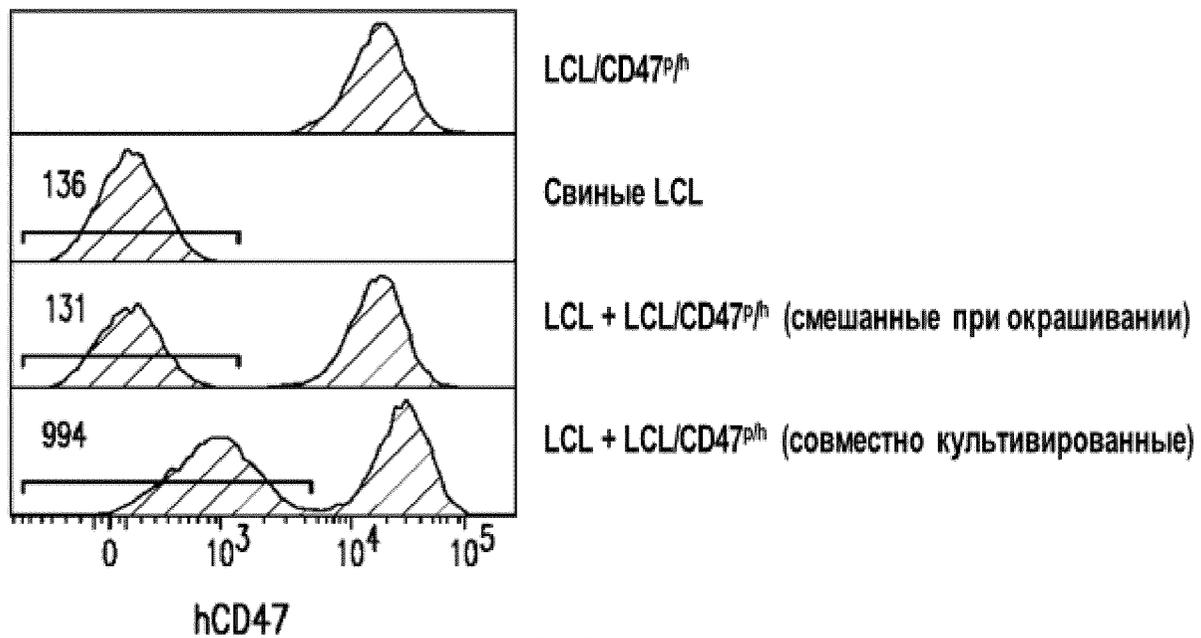
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

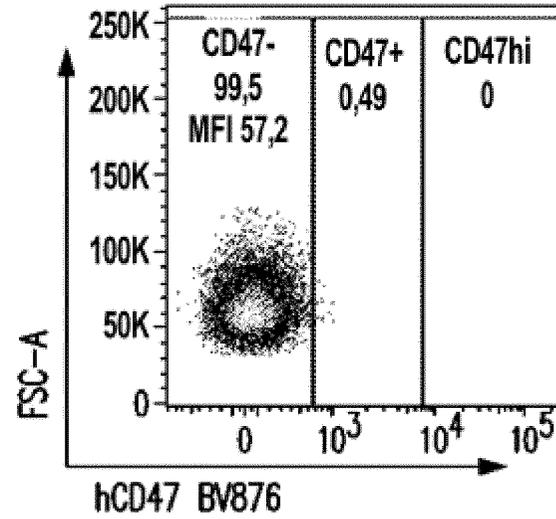


ФИГ. 1С



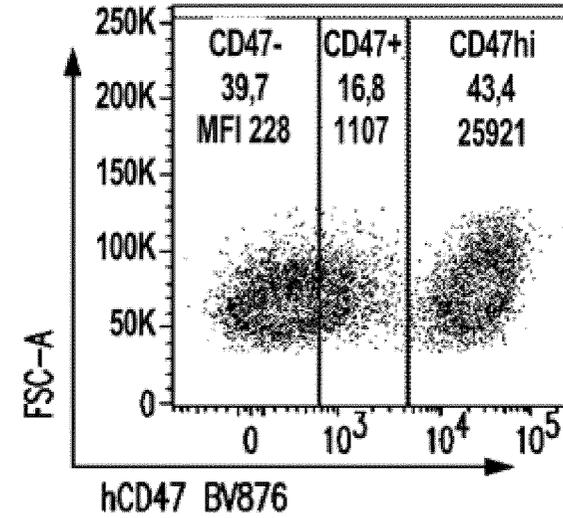
ФИГ. 2

CD47KO jurkat

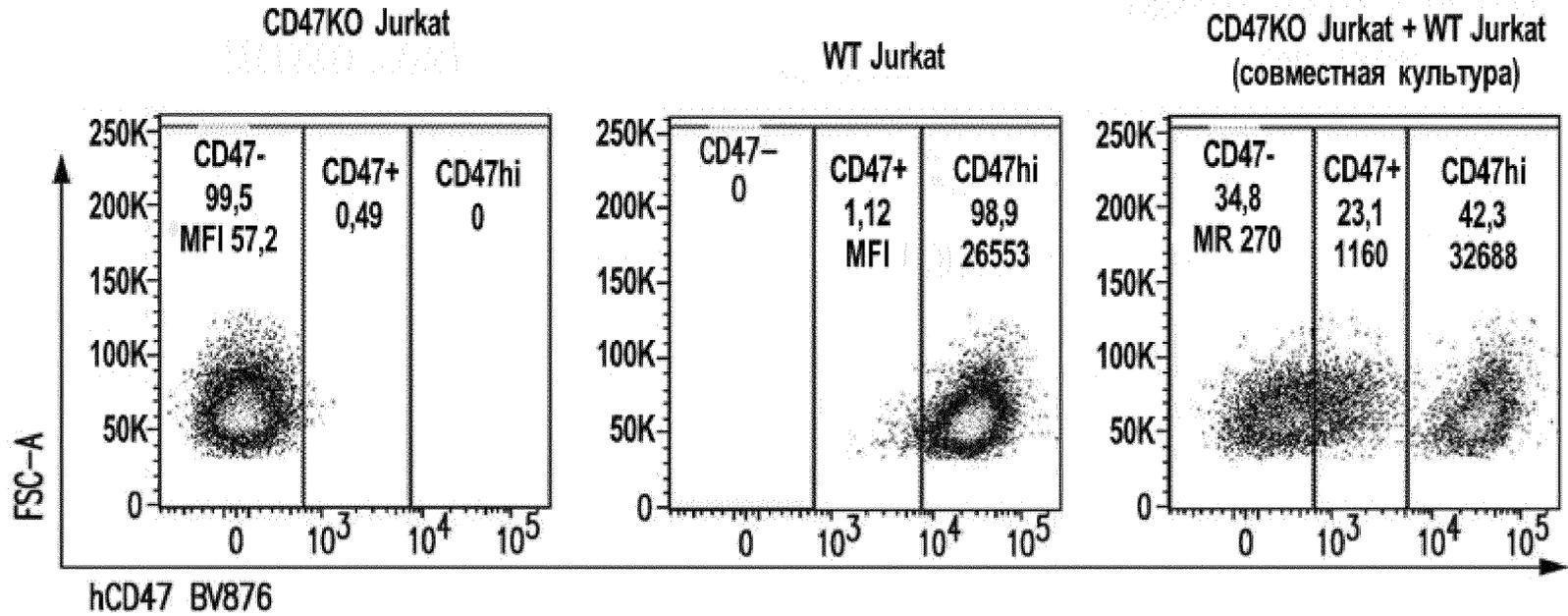


ФИГ. 3А

CD47KO jurkat + huCD47 LCL совместная культура



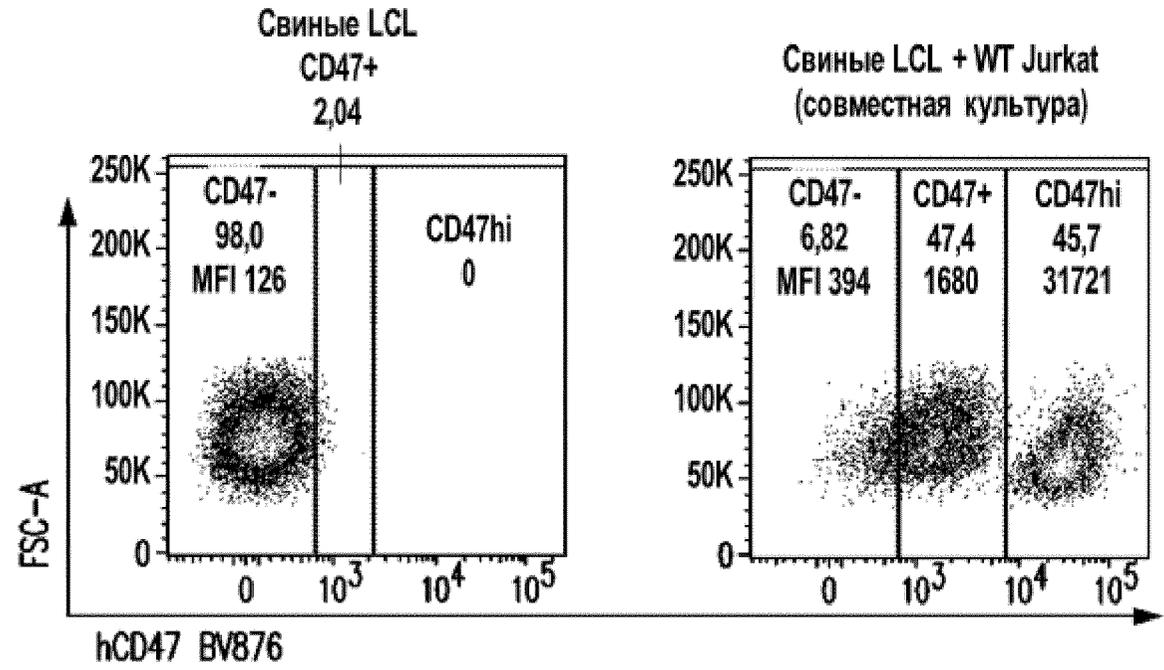
ФИГ. 3В



ФИГ. 4А

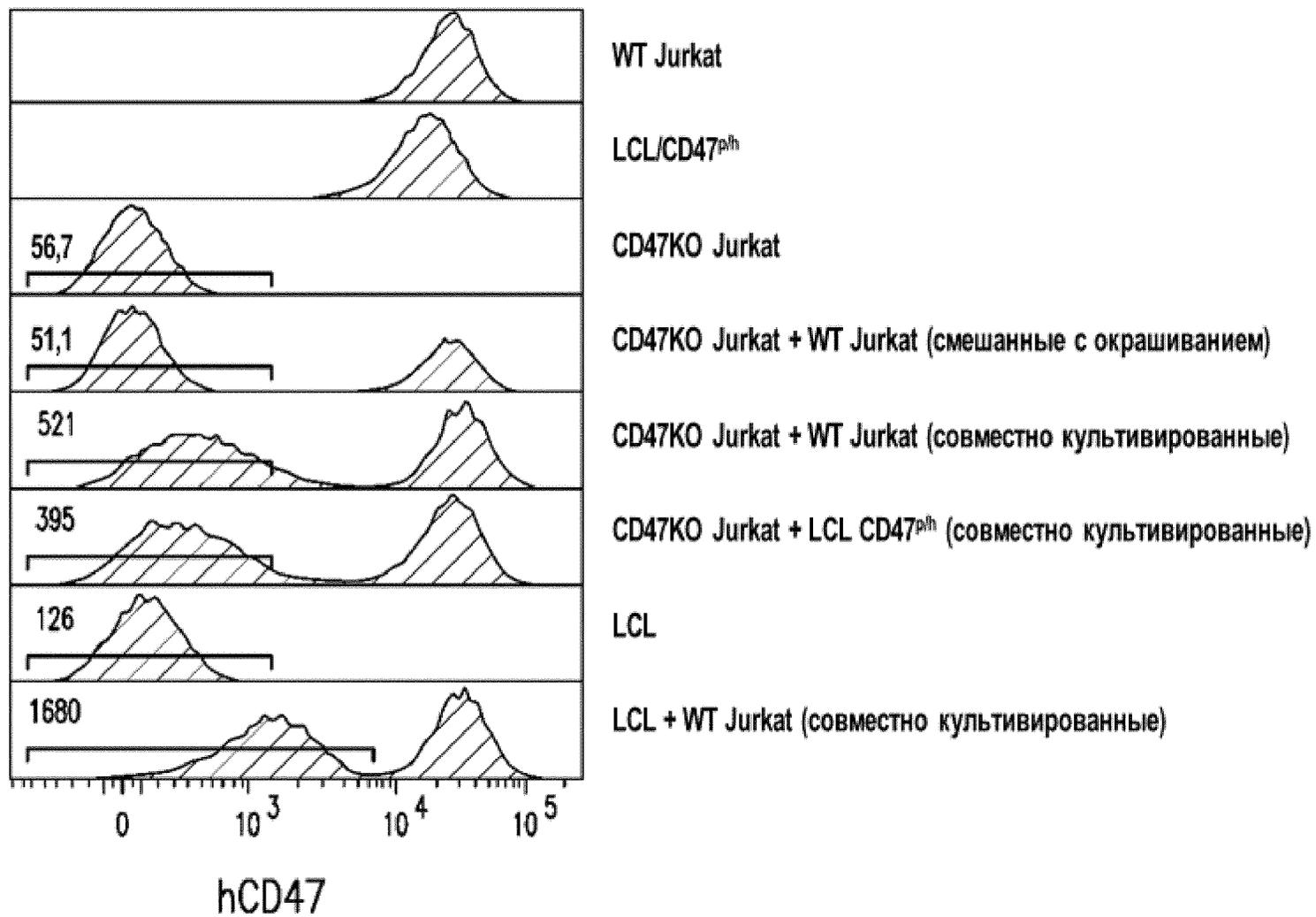
ФИГ. 4В

ФИГ. 4С

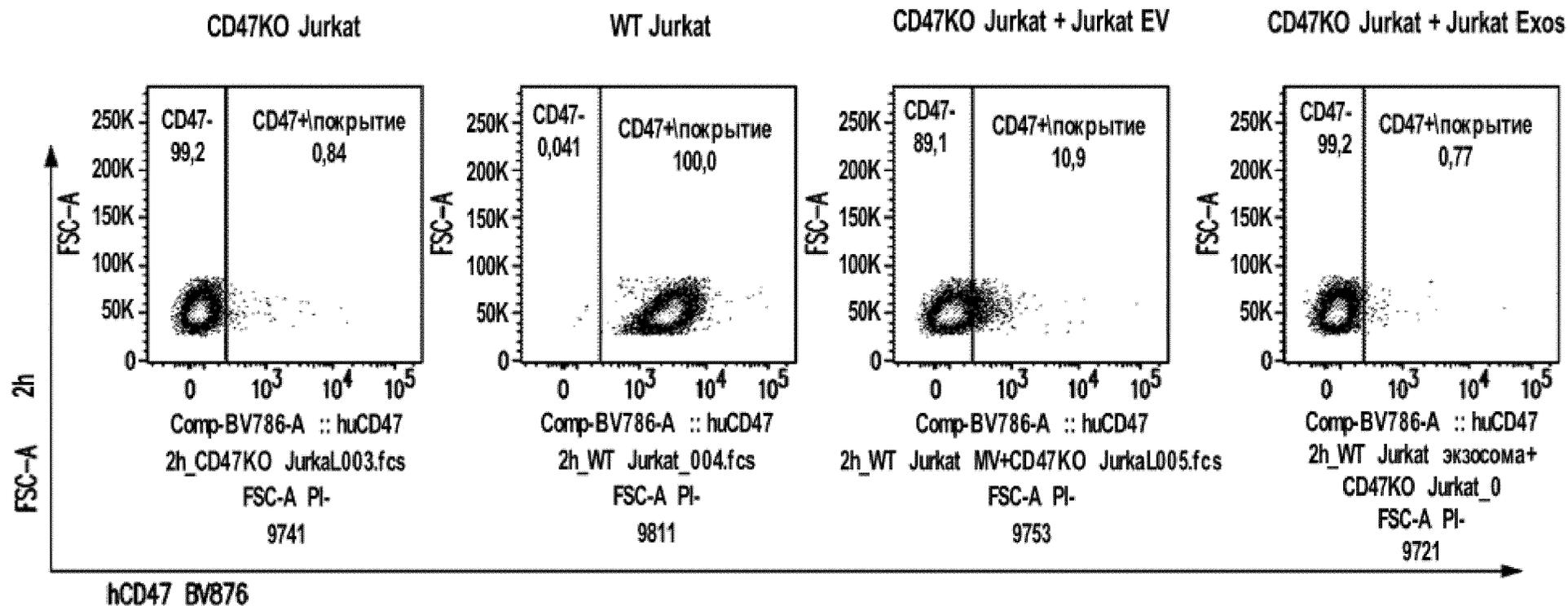


ФИГ. 5А

ФИГ. 5В



ФИГ. 6

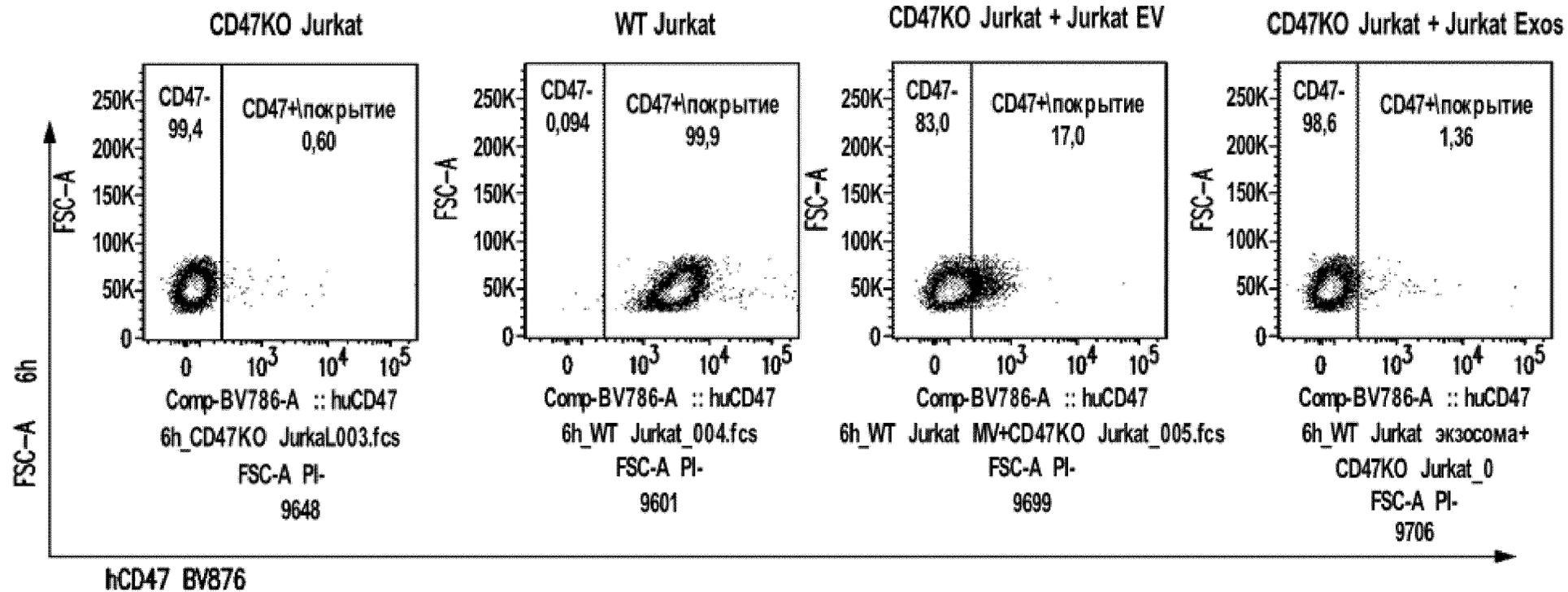


ФИГ. 7А

ФИГ. 7В

ФИГ. 7С

ФИГ. 7D

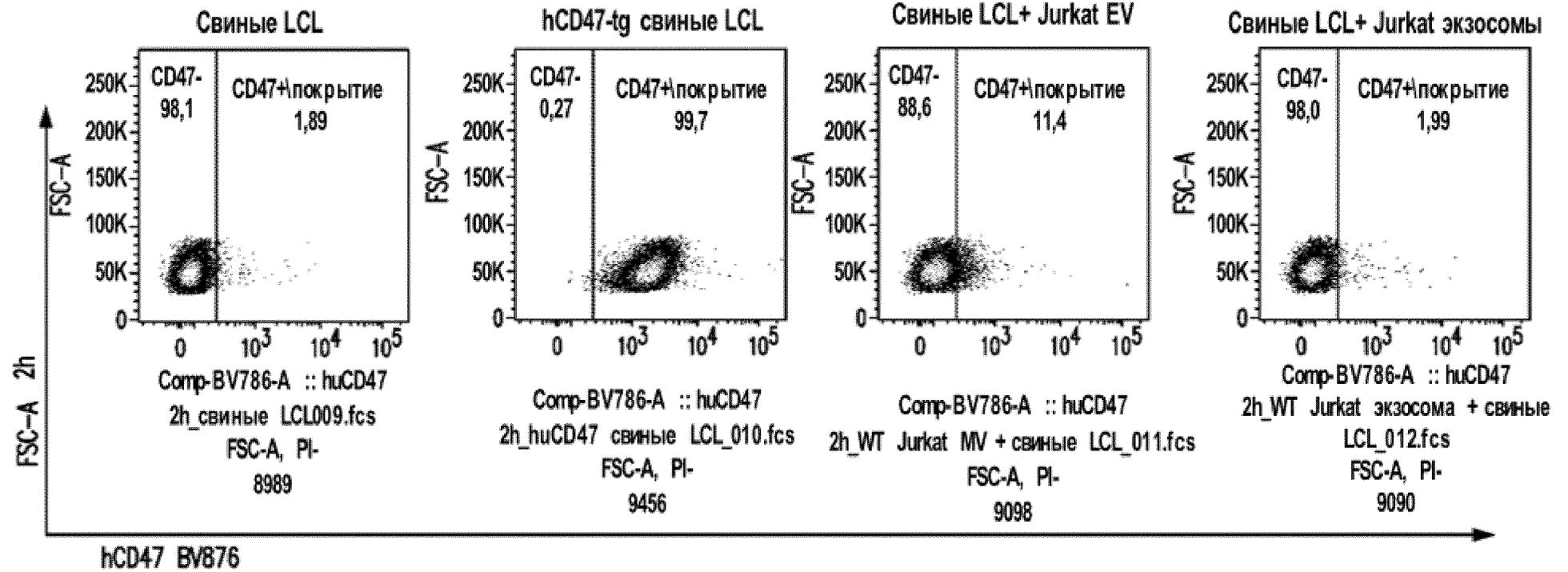


ФИГ. 8А

ФИГ. 8В

ФИГ. 8С

ФИГ. 8D

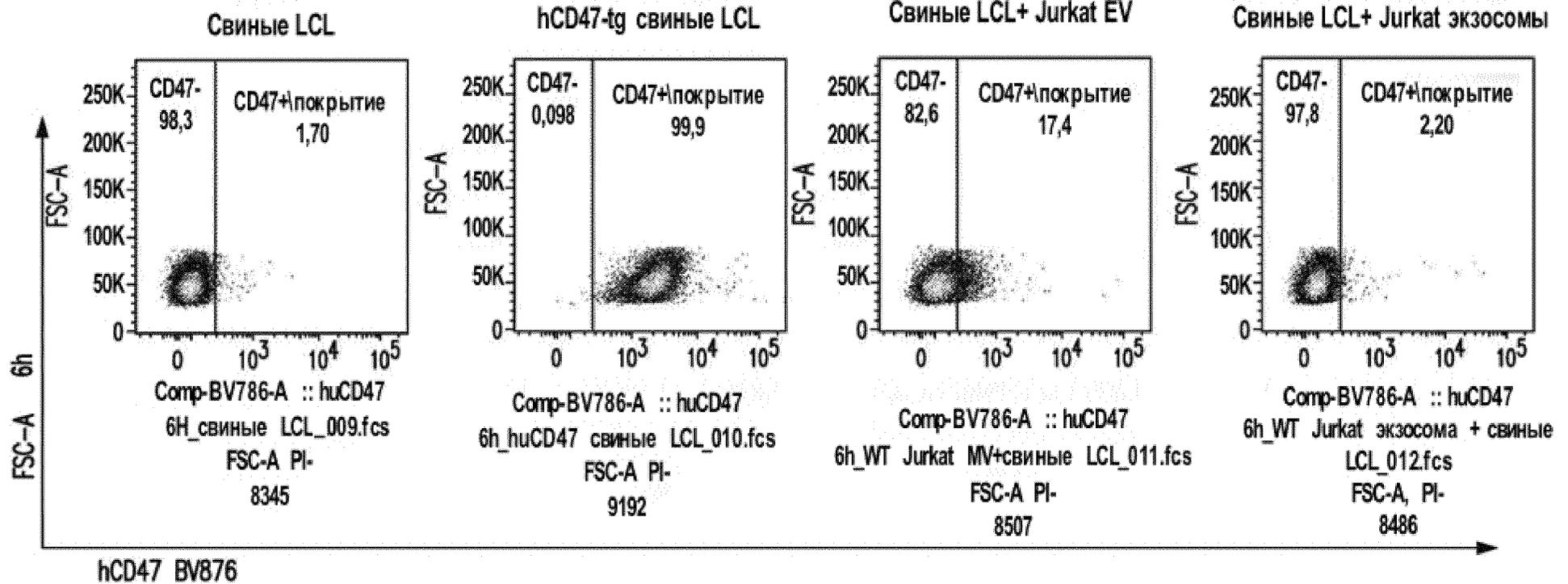


ФИГ. 9А

ФИГ. 9В

ФИГ. 9С

ФИГ. 9D



ФИГ. 10А

ФИГ. 10В

ФИГ. 10С

ФИГ. 10D