

RECEPTORES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO QUIMÉRICO

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La terapia celular adoptiva (ACT) que utiliza células T autólogas para mediar la regresión del cáncer se ha mostrado muy prometedora en los primeros ensayos clínicos. Se han adoptado varios enfoques generales, tales como el uso de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) o son reactivos a tumores que se producen de forma natural, expandidos ex vivo. Además, las células T pueden modificarse genéticamente para reorientarlas hacia antígenos tumorales definidos. Esto se puede hacer mediante la transferencia génica del péptido (p)-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) receptores de células T (TCRs) específicos o fusiones sintéticas entre un fragmento de anticuerpo de cadena única específico de tumor (scFv) y dominios de señalización de células T (por ejemplo, CD3 ζ), estos últimos denominados receptores de antígenos quiméricos (CARs). La transferencia de TIL y TCR se ha probado particularmente bien cuando se dirige al Melanoma (Rosenberg et al. 2011; Morgan 2006), mientras que la terapia CAR ha demostrado ser muy prometedora en el tratamiento de ciertas neoplasias malignas de células B (Grupp et al. 2013).

El protocolo de tratamiento general actual para ACT requiere un tratamiento de preacondicionamiento no mieloablativo inicial utilizando ciclofosfamida y/o fludarabina que elimina la mayoría de los linfocitos circulantes en los pacientes antes de la reinfusión de las células cultivadas ex

vivo. Esta deja espacio para que las nuevas células se expandan y elimina posibles 'sumideros de citoquinas' por los cuales las células normales compiten con las células recién infundidas para las señales de crecimiento y supervivencia. Junto con las células, los pacientes reciben apoyo de citoquinas a través de infusiones de altas dosis de interleucina (IL)-2 que ayuda a las nuevas células a injertarse y expandirse.

Hay una serie de factores que actualmente limitan la tecnología de ACT de células T. La terapia de preconditionamiento actual descrita anteriormente requiere ingreso hospitalario y potencialmente deja a los pacientes en un estado inmunodeprimido. Además, muchos pacientes no se encuentran en un estado lo suficientemente saludable como para poder soportar los rigores de este régimen de tratamiento. Más allá del preconditionamiento, el uso de IL-2 como terapia de apoyo se asocia con una toxicidad grave y un posible tratamiento de cuidados intensivos. De hecho, la terapia TIL en sí, a diferencia de la terapia TCR y CAR, no se ha asociado con ninguna toxicidad grave dentro o fuera del objetivo, y la mayoría de los eventos de toxicidad están asociados con las infusiones de IL-2 que lo acompañan.

Los métodos mediante los cuales el preconditionamiento y los tratamientos de apoyo con IL-2 pueden minimizarse o reducirse tendrán importantes beneficios, ya que: (i) reducirán la hospitalización del paciente, (ii) aumentarán la proporción de pacientes potenciales que podrían ser tratados por ACT, (iii) reducirán los costos clínicos asociado con un ingreso hospitalario extenso, abriendo así nuevamente la posibilidad de ACT a más pacientes.

Por tanto, existe la necesidad de nuevas terapias ACT que minimicen la necesidad de tratamientos de precondicionamiento y/o tratamientos de soporte de IL-2.

La presente invención usa células que expresan receptores de factores de crecimiento recombinante quimérico que pueden activarse o desactivarse mediante la administración de un ligando para CrGFR, que puede ser un fármaco clínicamente validado. Esto permite la expansión de las células diana in vivo con una toxicidad mínima para otras células.

Varios informes han utilizado la idea de la ingeniería del receptor del factor de crecimiento como un medio para expandir ciertas poblaciones de células o para el desarrollo de procesos de selección para estrategias de ingeniería de anticuerpos. Por ejemplo, varios informes han demostrado que las fusiones anticuerpo-TpoR o EpoR podrían usarse para una serie de estrategias biotecnológicas, como selecciones de anticuerpos de cadena única (Ueda et al. 2000, Kawahara et. Al. 2004), y una serie de informes han demostrado que las fusiones del receptor del factor de crecimiento pueden expandir con éxito la línea celular de megacariocitos Ba/F3 y/o las células madre hematopoyéticas (Jin et al. 2000; Richard et al. 2000; Nagashima et al. 2003; Kawahara et al. 2011; Saka et al. 2013).

El receptor de trombopoyetina (Tpo) (TpoR; CD110, c-mpl) normalmente se expresa en células del linaje de megacariocitos. En su estado normal, el TpoR se activa en respuesta a la trombopoyetina, que provoca la producción

de plaquetas por megacariocitos. También hay un circuito de retroalimentación negativa activa mediante el cual la expresión plaquetaria de TpoR puede usarse como sumidero para reducir los niveles circulantes de Tpo. Es importante destacar que TpoR no se expresa en ningún otro tejido normal o células cancerosas (Columbyova 1995).

Recientemente, un informe demostró que las células T podrían diseñarse con el TpoR de tipo natural que podría permitir la supervivencia controlada y la expansión de las células T mediante la administración de Tpo o Eltrombopag (Nishimura et al. 2018). Sin embargo, no ha habido informes de células T u otros linfocitos que se hayan diseñado para expresar receptores de factores de crecimiento quiméricos como receptores de fusión de trombopoyetina, y no hay informes del uso de estas células en ACT.

FIGURAS

Figura 1 - Representación esquemática de Receptores de Factor de Crecimiento Recombinantes Quiméricos que contienen dominios de factor de crecimiento. Estos receptores consisten en el dominio extracelular TpoR y dominio transmembrana que atraviesa la membrana plasmática. El dominio intracelular consiste en el dominio citoplásmico de TpoR fusionado a uno o más dominios adicionales que aumentan la actividad general del receptor y pueden derivarse de una selección de un dominio de factor de crecimiento, dominio de señalización conjunta o dominio coestimulador como se detalla en la leyenda de la figura.

$\Delta 60$ = TpoR con delección del extremo C de 60 aminoácidos, IL2r β cyt = dominio citoplasmático de la cadena beta del receptor de IL2, SLAM = SLAM / CD150, TIAF1 = factor 1 antiapoptótico inducido por TGF β , TLR1 = receptor 1 tipo Toll, CD40 = CD40/TNFRSF5, IL2r γ = cadena gamma común del receptor de IL-2, ITAM1 = motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor de CD3 ζ , LMP1 = Proteína 1 de la membrana latente del virus de Epstein Barr.

Figura 2 - Representación Esquemática de Receptores de Factor de Crecimiento Recombinantes Quiméricos que contienen dominios coestimuladores. Estos receptores consisten en el dominio extracelular de TpoR y el dominio transmembrana que se extiende por la membrana plasmática. El dominio intracelular consiste en un dominio coestimulador obtenido de un receptor coestimulador definido como, pero no limitado a, CD28 o CD137.

Figura 3 - Representación esquemática de la organización génica del transgén lentiviral. El transgén de TpoR se optimizó por codones y se clonó corriente abajo del promotor EF1 α mediante un par de digestión de restricción XbaI y NheI en el vector Lentiviral Lenti pSF.

Figura 4 - Análisis de flujo de los Receptores del Factor de Crecimiento recombinante quimérico de tipo natural (WT) y variante, no transducidos en células Jurkat E6.1. Se transdujeron células T Jurkat E6.1 con partículas lentivirales que portaban los transgenes indicados. Se evaluó la

expresión 72 horas después de la infección utilizando anticuerpos anti-CD110-PE.

Figura 5 - Análisis de la actividad del Receptor del Factor de Crecimiento recombinante quimérico en células Ba/F3. La línea de células B murinas dependiente de citoquinas Ba/F3 se transdujo con los CrGFRs indicados y se incubó con IL-3 o Eltrombopag durante 10 días. La expresión de CrGFR se evaluó mediante citometría de flujo en los puntos de tiempo indicados usando anticuerpos CD110.

Figura 6 - Análisis de Eltrombopag e IL-2 en células T humanas primarias del Donante 1. Se transdujeron células T humanas primarias del donante 1 con el WT TpoR o la variante CrGFR y se incubaron en presencia de IL2 o Eltrombopag. Las células se eliminaron en puntos de tiempo hasta 21 días y la proporción de células que expresan el receptor evaluado usando PE conjugado anticuerpos anti-CD110 y un analizador MACSQuant.

Figura 7 - Análisis de Eltrombopag e IL-2 en células T humanas primarias del Donante 2. Se transdujeron células T humanas primarias del donante 2 con WT TpoR o variante CrGFR y se incubaron en presencia de IL2 o Eltrombopag. Las células se eliminaron en puntos de tiempo hasta 21 días y la proporción de células que expresan el receptor evaluado usando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE y un analizador MACSQuant.

Figura 8 -Análisis de Eltrombopag e IL-2 en células T humanas primarias del donante 3. Se transdujeron células T humanas primarias del donante 3 con WT TpoR o variante CrGFR y se incubaron en presencia de IL2 o Eltrombopag. Las células se eliminaron en puntos de tiempo hasta 21 días y la proporción de células que expresan el receptor se evaluaron usando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE y un analizador MACSQuant.

Figura 9 - Selección de CrGFRs óptimos para la siguiente ronda de análisis. Los gráficos de citometría de flujo que muestran la expresión de CrGFRs en células T humanas primarias de donantes x3 después de 21 días de incubación en Eltrombopag. Los receptores TpoR.CD40, TpoR.IL2ry, TpoR.ITAM1, TpoR.Δ60, TpoR.LMP1-cyto y TpoR.TpoR-cyto.LMP1-cyto fueron elegidos para futuras comparaciones con el wt TpoR.

Figura 10-Análisis de Eltrombopag e IL-2 en células T humanas primarias clasificadas con CrGFR del Donante 4. Se transdujeron células T humanas primarias del donante 4 con el WT TpoR o la variante CrGFR y se enriquecieron para su expresión mediante la tecnología MACS de Miltenyi seleccionada para e incubados en presencia de IL2 o Eltrombopag. Las células se eliminaron en puntos de tiempo hasta 7 días y el número de células que expresan el receptor evaluados usando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE, colorante de viabilidad DRAQ7 y analizador MACSQuant.

Figura 11 - Análisis de Eltrombopag e IL-2 en células T humanas primarias clasificadas con CrGFR del Donante 5. Las células T humanas

primarias del donante 5 se transdujeron con el WT TpoR o variante de CrGFR, y enriquecido para la expresión mediante tecnología MACS de Miltenyi seleccionada por e incubada en presencia de IL2 o Eltrombopag. Las células se extrajeron en puntos de tiempo hasta 7 días y se evaluó el número de células que expresan el receptor usando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE, colorante de viabilidad DRAQ7 y analizador MACSQuant.

Figura 12 - Análisis de Eltrombopag e IL-2 en células T humanas primarias clasificadas por CrGFR del Donante 6. Se transdujeron células T humanas primarias del donante 6 con WT TpoR o variante CrGFR, y se enriquecieron para la expresión mediante tecnología MACS de Miltenyi seleccionada para e incubada en presencia de IL2 o Eltrombopag. Las células se extrajeron en puntos de tiempo hasta 7 días y se evaluó el número de células que expresan el receptor usando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE, colorante de viabilidad DRAQ7 y analizador MACSQuant.

Figura 13 - Análisis de Receptores del Factor de Crecimiento Recombinante Quimérico en TIL042. Los Linfocitos Infiltrantes de Tumores de TIL042 se transdujeron con WT TpoR o la variante CrGFR indicada y se incubaron en presencia de líneas tumorales emparejadas con el paciente con la adición de IL2, Eltrombopag, IL-2 + Eltrombopag o sin factores de crecimiento. Las células se analizaron y contaron los días 4 y 7 y se evaluó el número de células que expresan el receptor utilizando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE, colorante de viabilidad DRAQ7 y analizador MACSQuant. Los gráficos muestran recuentos entre los días 4 y 7 cuando la recuperación de TIL ocurre

después de una contracción inicial en números impulsada por factores reguladores de tumores y/o muerte celular inducida por activación.

Figura 14 - Análisis de Receptores del Factor de Crecimiento Recombinante Quimérico en TIL Ovárico. Los Linfocitos Infiltrantes de Tumores de TIL ovárico x3 fueron transducidos con el WT TpoR o indicaron la variante CrGFR y se incubaron en presencia de células tumorales emparejadas con el paciente con Eltrombopag o sin factores de crecimiento. Las células se analizaron y contaron los días 4 y 7 y se evaluó el número de células que expresaban el receptor usando anticuerpos anti-CD110 conjugados con PE, colorante de viabilidad DRAQ7 y un analizador MACSQuant. Los gráficos muestran recuentos entre los días 4 y 7 cuando se produce la recuperación de TIL después de una contracción inicial en números impulsados por factores reguladores de tumores y/o muerte celular inducida por activación.

Figura 15 - Inducción de pSTAT por receptores del factor de crecimiento recombinante quimérico. Se aislaron células T humanas primarias y se transdujeron con el CrGFR indicado. Las células se enriquecieron para la expresión de CrGFR utilizando tecnología MACS de Miltenyi y se expandieron mediante estimulación policlonal. Las células enriquecidas se estimularon durante 4 horas con medio solo (RPMI), IL2, IL 12, Tpo o Eltrombopag (Elt) antes de la fijación con metanol y la tinción intracelular con anticuerpos hacia fosfo-STAT5.

RESUMEN DE ASPECTOS DE LA INVENCION

Los presentes inventores han demostrado que es posible diseñar linfocitos, incluidas las células T y células NK que comprenden un CrGFR que puede funcionar como un interruptor de crecimiento. Esto permite que los linfocitos se expandan in vivo mediante la administración del ligando CrGFR al paciente. Los inventores han demostrado que un CrGFR, por ejemplo, basado en el receptor de trombopoyetina (Tpo) (TpoR; CD110, c-mpl), induce la proliferación del linfocito diseñado tras la unión de un ligando de CrGFR al receptor. Por tanto, el ligando provoca la proliferación de células o la protección contra muerte celular inducida por activación, que expresa el CrGFR pero que se espera que tenga una baja toxicidad debido a la ausencia, o baja expresión, de receptores en otras células del paciente. Los CrGFR basados en TpoR u otros receptores de factores de crecimiento relacionados serían una herramienta valiosa para aumentar la expansión de linfocitos en el vítreo e in vivo para las terapias de células adoptivas.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un linfocito, que incluye una célula T o una célula NK, que comprende un receptor del factor de crecimiento recombinante quimérico (CrGFR) que comprende:

- (i) un dominio extracelular (EC);
- (ii) un dominio transmembrana (TM) de trombopoyetina; y
- (iii) un primer dominio intracelular (IC); y, opcionalmente, (iv) un segundo dominio intracelular.

El CrGFR está diseñado de manera que la unión del ligando del receptor al CrGFR da como resultado la activación del receptor y la señalización del crecimiento a la célula para inducir la proliferación y/o supervivencia.

El ligando puede ser trombopoyetina humana o un agonista del receptor de trombopoyetina, por ejemplo Eltrombopag, Lusotrombopag, Avatrombopag o Romiplostim.

El dominio EC puede ser el dominio EC de c-mpl humano (que se une a Tpo humana) o puede ser uno o más de i) un dominio EC truncado, ii) un dominio EC de c-mpl truncado, iii) un marcador de selección, para ejemplo CD34.

El dominio IC del CrGFR puede incluir un dominio de unión a JAK. El dominio IC consta de dos o más receptores del factor de crecimiento u otros dominios de señalización donde uno puede ser de la lista de: receptor de la hormona del crecimiento humana, receptor de prolactina humana o receptor de trombopoyetina humano (c-mpl) y factor de crecimiento adicional u otros dominios de señalización que pueden derivarse de la lista de (pero no limitados a): dominios de señalización del receptor de citocinas (por ejemplo, receptor de IL2), dominios de coseñalización (por ejemplo, CD40), proteínas oncogénicas virales (por ejemplo, LMP1), dominios coestimuladores (por ejemplo, CD28, CD137, CD150, etc.) u otros dominios mitógenos (por ejemplo, receptores tipo Toll, motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina, dominios de señalización de CD3, etc.).

El linfocito puede ser una célula T, incluyendo un Linfocito Infiltrante de Tumor (TIL), una célula reguladora T (Treg) o una célula T primaria, una célula NK o una célula dendrítica.

Además del CrGFR, los linfocitos, células T o NK pueden incluir un receptor de célula T recombinante (TCR) o receptor de antígeno quimérico (CAR).

En un segundo aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica el CrGFR.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto y, si está presente, una secuencia de ácido nucleico TCR y/o CAR.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para producir un linfocito, o una célula T o NK, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico que codifica el CrGFR, o vector, en el linfocito.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con el tercer aspecto, o un linfocito (que incluye una célula T o NK) de acuerdo con el primer aspecto, junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método de expansión celular in vivo que comprende la administración de linfocitos, o células T o NK, del primer aspecto, o composición farmacéutica del quinto aspecto a un sujeto. Las células se pueden expandir in vivo administrando trombopoyetina, o un agonista de trombopoyetina, tal como Eltrombopag, a un sujeto.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un linfocito, que incluye una célula T o NK, de acuerdo con el primer aspecto, o vector de acuerdo con el tercer aspecto, para uso en terapia celular adoptiva.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un linfocito, que incluye una célula T o NK, de acuerdo con el primer aspecto, o un vector de acuerdo con el tercer aspecto, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

En un noveno aspecto, la invención proporciona el uso de un linfocito de acuerdo con el primer aspecto, o el uso del vector de acuerdo con el tercer aspecto en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.

En un décimo aspecto, la invención proporciona Eltrombopag o Tpo para su uso en terapia celular adoptiva.

En un undécimo aspecto, la invención proporciona Eltrombopag o Tpo para su uso en la expansión in vivo de linfocitos, incluidas las células T o NK.

En un duodécimo aspecto, la invención proporciona un linfocito del primer aspecto para usar en combinación con trombopoyetina o un agonista del receptor de trombopoyetina, por ejemplo Eltrombopag, en el tratamiento de un cáncer.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO RECOMBINANTE QUIMÉRICO (CrGFR)

En el presente documento se proporcionan receptores del factor de crecimiento recombinante (CrGFR) que comprenden: (i) un dominio extracelular (EC); (ii) un dominio transmembrana (TM) de trombopoyetina; y (iii) un dominio intracelular (IC) del receptor del factor de crecimiento quimérico. En una forma simple, el CrGFR puede contener el receptor de Tpo humano de longitud completa (como se proporciona en la Figura 1 en este documento) o un derivado o variante del mismo que mantiene la señalización y la proliferación celular en respuesta a la unión del ligando (por ejemplo, esto puede incluir un dominio de señalización de trombopoyetina truncado que ha demostrado que mantiene la capacidad de señalización). El CrGFR puede ser de forma modular con los dominios EC, TM e IC derivados de diferentes receptores. Sin embargo, el CrGFR debe mantener su capacidad para transmitir una señal de crecimiento a la célula al unirse al ligando. El CrGFR puede activarse y transmita la señal de crecimiento a la célula tras la unión del ligando al dominio

TM. El dominio de señalización puede contener uno o más dominios de señalización adicionales.

Los CrGFRs adecuados pueden seleccionarse basándose en los GFRs con expresión limitada en tejido humano normal, por ejemplo, los GFR que se expresan solo en una población de células pequeñas o confinadas a un tipo de célula específico, por ejemplo, c-kit. Alternativamente, el dominio de unión al ligando nativo del receptor del factor de crecimiento se puede eliminar y, por ejemplo reemplazar con un marcador u otro dominio EC.

El CrGFR puede comprender un dominio EC sin función de unión al factor de crecimiento (por ejemplo, una forma truncada del dominio TpoR EC) y/o un marcador (por ejemplo, CD34), y los dominios TM e IC de TpoR. El crecimiento de células portadoras de este tipo de receptor puede ser estimulado por la unión de Eltrombopag al dominio TM.

El CrGFR puede expresarse solo bajo el control de un promotor en una población terapéutica de células que tienen actividad terapéutica, por ejemplo, Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TILs).

Alternativamente, el CrGFR puede expresarse junto con un transgén terapéutico como un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) y/o un receptor de células T (TCR), por ejemplo, como se describe en la Figura 14. Los TCRs y CAR adecuados son bien conocidos en la literatura, por ejemplo, TCRs específicos de HLA-A*02-NYESO-1 (Rapoport et al. Nat Med 2015) o CARs de

fusión anti-CD19scFv.CD3 ζ (Kochenderfer et al. J Clin Oncol 2015) que se han utilizado con éxito para tratar Mieloma o Neoplasias malignas de células B respectivamente. Los CrGFRs descritos en este documento pueden expresarse con cualquier CAR o TCR conocido, proporcionando así a la célula un cambio de crecimiento regulable para permitir la expansión / supervivencia celular in-vitro o in-vivo, y un mecanismo de activación convencional en forma de TCR o CAR para actividad anticancerígena. Por lo tanto, la invención proporciona una célula para uso en terapia celular adoptiva que comprende un CrGFR como se describe en el presente documento y un TCR y/o CAR que específicamente se une a un antígeno asociado a un tumor.

El CrGFR puede tener el dominio TM y el primer dominio IC del receptor de Tpo humano y un dominio EC del receptor de Tpo de tipo natural o truncado (sin función de unión al ligando nativo).

Las modalidades particulares del CrGFR incluyen las mostradas en las Figuras 1 y 2.

En algunas modalidades, el receptor del factor de crecimiento (CrGFR) se construye de manera que el CrGFR se basa en el receptor TpoR con por lo menos la región TM y la región IC (ver SEC ID No. 1 que muestra el dominio TpoR TM y el dominio citoplásmico 514-635 y TpoR) que se retiene y con un (segundo) dominio IC adicional que se agrega al constructo para mejorar la señalización en respuesta a la unión de agonista de Tpo o Tpo. Por lo tanto, en algunas modalidades, el CrGFR comprende: (i) un dominio extracelular (EC) de

TpoR, o un dominio EC de TpoR truncado; (ii) un dominio trombopoyetina transmembrana (TM); y (iii) un primer dominio intracelular (IC) que comprende un dominio IC de trombopoyetina humana (o una versión truncada del mismo, por ejemplo, delta 60); y (iv) un segundo dominio intracelular, en el que el segundo dominio intracelular se selecciona de un dominio IC de un receptor coestimulador, un receptor de citocina, un receptor de señalización conjunta o un receptor de trombopoyetina humano (c-mpl). Por ejemplo, el segundo dominio IC puede ser el dominio IC de CD40, IL2R (IL2r β , IL2R γ), ITAM1 o LMP1.

En algunas modalidades, el crGFR comprende i) un dominio EC; y los dominios TM e IC mostrados en SEC ID No. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14, o variantes de los mismos que tienen por lo menos 80%, 85%, 90% 95% 97% o 99% de identidad de secuencia. Los dominios EC adecuados incluyen aquellos descritos en el presente documento, por ejemplo, un dominio EC de TpoR truncado. Estos receptores conservan su capacidad para unir trombopoyetina humana o un agonista del receptor de trombopoyetina.

En otras modalidades, el dominio IC de wt Tpo se reemplaza con un dominio IC de un receptor adecuado, por ejemplo, LMP1, IL2R, CD28 o CD137; ejemplos de tales constructos se muestran en la Figura 1 como y "TpoR. LMP1" "TpoR. IL2r β -cyt.TpoR-cyt" y la Figura 2 "TpoRec.TpoRtm CD28cyto" y "TpoRec.TpoRtm CD137cyto".

DOMINIO EC

El dominio EC puede ser el dominio EC de TpoR (SEC ID No: 1) o un derivado o variante del mismo que mantiene la señalización y la proliferación celular en respuesta a la unión del ligando al receptor.

Es posible que el dominio EC no sea necesario para la señalización CrGFR, por ejemplo, si se usa el dominio TM que puede causar la activación del receptor tras la unión del ligando, por ejemplo, el dominio TpoR TM. El dominio EC puede ser entonces un dominio nativo truncado o mutado (por ejemplo, sin función de unión al ligando), por ejemplo, un dominio EC de TpoR truncado. El dominio EC nativo puede reemplazarse por un marcador como CD34 truncado para selección y/o monitoreo in vivo.

DOMINIO TM

Puede usarse el dominio TM (mostrado en la Figura 1) del receptor Tpo (TpoR), que incluye un derivado o variante del mismo que mantiene la señalización y la proliferación celular en respuesta a la unión del ligando al receptor. Esto puede ser útil porque se sabe que TpoR tiene una expresión limitada en tejidos humanos normales y también se sabe que se une a Eltrombopag, Lusutrombopag y Avatrembopag, por tanto, un CrGFR que comprende un dominio TM del receptor de Tpo puede activarse exponiendo las células in vitro o in vivo a un compuesto clínicamente validado con un perfil de toxicidad conocido.

DOMINIO IC

El dominio intracelular (IC) del receptor del factor de crecimiento (que se muestra en la SEC ID No. 1) del receptor de Tpo se puede usar incluyendo un derivado o una variante del mismo que mantiene la señalización y la proliferación celular en respuesta a la unión del ligando al receptor (por ejemplo, un dominio de señalización de TpoR truncada como el mostrado en SEC ID No. 2). Esto se puede combinar con el dominio TM del receptor de Tpo para lograr buenos niveles de proliferación celular en respuesta a la unión del ligando.

Otros dominios IC que son como el receptor del factor de crecimiento pueden ser adecuados para su uso en la construcción de los CrGFRs de la presente invención, ya que se sabe que estos receptores activan las mismas vías de señalización celular que el receptor de Tpo. Por ejemplo, los dominios IC de G-CSF, GM-CSF, prolactina u hormona de crecimiento humana pueden usarse para construir CrGFR cuando se combinan con el dominio TpoR TM. La capacidad de un CrGFR que comprende estos dominios IC para inducir la proliferación celular en respuesta a un agonista del receptor, por ejemplo, Eltrombopag, puede determinarse entonces usando los métodos descritos en los Ejemplos de la presente invención. El dominio TpoR IC puede estar truncado hasta en 79 aminoácidos en el extremo C-terminal. Se ha demostrado que los truncamientos por encima de esto anulan completamente la actividad de TpoR (Gurney et al. PNAS 1995).

Adicionalmente, el dominio IC también puede comprender un segundo dominio derivado de uno de los siguientes (pero no limitado a): dominios de señalización del receptor de citocinas (por ejemplo, receptor de IL2), dominios de señalización conjunta (por ejemplo, CD40), proteínas oncogénicas virales (por ejemplo, LMP1), dominios coestimuladores (por ejemplo, CD28, CD137, CD150, etc.) u otros dominios mitogénicos (por ejemplo, receptores tipo Toll, motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores, dominios de señalización de CD3, etc.).

Los receptores de citocinas son un grupo amplio de receptores expresados en una multitud de tipos de células y participan en la detección de señales ambientales extracelulares al unirse a citocinas solubles. Este evento de unión provoca una cascada de señalización a través de la señalización JAK / STAT que da como resultado la regulación positiva de los genes implicados en la supervivencia y expansión. Dichos receptores incluyen el receptor de IL-2, el receptor de IL-4 y el receptor de trombopoyetina (Liongue et al. 2016). Los receptores coestimuladores son proteínas involucradas en la mejora de la actividad de las células T cuando la célula recibe una señal primaria a través del receptor de células T. Esto se basa en el concepto de Señal 1 y Señal 2, según el cual la Señal 1 se envía a través de la participación del receptor de células T con el péptido-MHC, y la señal 2 se entrega a través de la participación de receptores coestimuladores en la célula T con ligandos coestimuladores en las células diana (por ejemplo, célula dendrítica). La señal 2 entregada a través del dominio coestimulador proporciona señales de supervivencia cruciales para la célula T. Los receptores coestimuladores

comunes incluyen CD28, CD137 y CD150 (Leitner et al. 2010). El término señalización conjunta define grupos de proteínas de la membrana celular que proporcionan señales de apoyo similares a las descritas para los receptores coestimuladores, pero bajo ciertas circunstancias normalmente no se pueden considerar coestimulantes ya que pueden no expresarse en las células T, tales receptores incluyen CD40 que está normalmente expresado en células presentadoras de antígeno donde mejora la supervivencia tras la participación de ligando CD40 expresado en células T (He et al. 2012; Kumar et al. 2018).

Este segundo dominio IC puede fusionarse directamente, o mediante un dominio enlazador, al extremo C del primer dominio IC (por ejemplo, el dominio IC TpoR que está dispuesto junto al dominio de transmembrana Tpo). Por lo tanto, el receptor del factor de crecimiento quimérico puede comprender un dominio transmembrana de TpoR y un dominio IC de TpoR (primer dominio IC) y un segundo dominio IC que puede ser de TpoR, o puede ser un dominio de señalización del receptor de citocina, dominio de señalización conjunta, proteínas oncogénicas virales (por ejemplo, LMP1) o dominios coestimuladores como los discutidos en el párrafo anterior.

Adicionalmente, el dominio coestimulador, coinhibidor o de señal conjunta puede fusionarse directamente con el dominio transmembrana de TpoR para crear receptores como los que se muestran en la Figura 2 y las SEC ID No. 13 y 14. Estos receptores pueden comprender un (segundo) dominio IC adicional, como un Dominio TpoR.

CÉLULAS

Las células utilizadas en la presente invención pueden ser cualquier linfocito que sea útil en la terapia celular adoptiva, tal como una célula T o una célula asesina natural (NK), una célula NKT, una célula T gamma / delta o una célula reguladora T. Las células pueden ser alogénicas o autólogas.

Las células T o linfocitos T son un tipo de linfocito que tiene un papel central en la inmunidad mediada por células. Se pueden distinguir de otros linfocitos, como las células B y las células asesinas naturales (células NK), por la presencia de un receptor de células T (TCR) en la superficie celular. Existen varios tipos de células T, como se resume a continuación.

Las células T citotóxicas (células TC o CTLs) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Las CTLs expresan la molécula CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC de clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de IL-10, la adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8+ pueden inactivarse a un estado anérgico, lo que previene enfermedades autoinmunes como la encefalomielitis autoinmune experimental.

Las células T de memoria son un subconjunto de células T específicas de antígeno que persisten a largo plazo después de que se ha resuelto una

infección. Se expanden rápidamente a un gran número de células T efectoras al volver a exponerse a su antígeno afín, proporcionando así al sistema inmunológico "memoria" contra infecciones pasadas. Las células T de memoria comprenden tres subtipos: células T de memoria central (células TCM) y dos tipos de células T de memoria efectoras (células TEM y células TEMRA). Las celdas de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. Las células T de memoria expresan típicamente la proteína de superficie celular CD45RO.

Las células T reguladoras (células Treg), antes conocidas como células T supresoras, son cruciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Su función principal es apagar la inmunidad mediada por células T hacia el final de una reacción inmune y para suprimir las células T autorreactivas que escaparon del proceso de selección negativa en el timo.

Se han descrito dos clases principales de células CD4+ Treg: células Treg de origen natural y células Treg adaptativas.

Las células Treg de origen natural (también conocidas como células Treg CD4+CD25+FoxP3+) surgen en el timo y se han relacionado con interacciones entre las células T en desarrollo con células dendríticas tanto mieloides (CD11c+) como plasmocitoides (CD123+) que se han activado con TSLP. Las células Treg de origen natural se pueden distinguir de otras células T por la presencia de una molécula intracelular llamada FoxP3.

Las células Treg adaptativas (también conocidas como células Tr1 o células Th3) pueden originarse durante una respuesta inmune.

Las células asesinas naturales (o células NK) son un tipo de célula citolítica que forma parte del sistema inmunológico innato. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las señales innatas de las células infectadas por virus de una manera independiente del MHC.

Las células NK (que pertenecen al grupo de células linfoides innatas) se definen como linfocitos granulares grandes (LGL) y constituyen el tercer tipo de células diferenciadas del progenitor linfoide común que genera linfocitos B y T.

ÁCIDOS NUCLEICOS

Un aspecto de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico de la invención, que codifica cualquiera de los CrGFRs, polipéptidos o proteínas descritos en este documento (incluidas las porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos).

Como se usa en este documento, los términos "polinucleótido", "nucleótido" y "ácido nucleico" pretenden ser sinónimos entre sí.

Un experto en la materia entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse

que las personas expertas en la técnica pueden, utilizando técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia de polipéptidos codificada por los polinucleótidos descritos aquí para reflejar el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que se van a expresar los polipéptidos, por ejemplo, optimización de codones.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyan dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que los polinucleótidos pueden ser modificados por cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo para mejorar la actividad in vivo o la vida útil de los polinucleótidos de interés.

Los términos "variante", "homólogo" o "derivado" en relación con una secuencia de nucleótidos incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, delección o adición de uno (o más) ácido nucleico de o a la secuencia.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar las secuencias de proteínas que se muestran en las SEC ID NOs. 3 a 14 o variantes de la misma,

incluida una secuencia de ácido nucleico que codifica o comprende una forma truncada del receptor de Tpo, como la que se muestra en la SEC ID No 2.

La secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia de nucleótidos de TpoR mostrada en las SEC ID Nos. 17 a 28, o variantes de la misma.

La invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un CrGFR y una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un receptor de células T (TCR) y/o un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Las secuencias de ácido nucleico pueden unirse mediante una secuencia que permita la coexpresión de dos o más secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, el constructo puede comprender un promotor interno, una secuencia interna de entrada del ribosoma (IRES) o una secuencia que codifica un sitio de escisión. El sitio de escisión puede ser autoescindible, de modo que cuando se produce el polipéptido se divide inmediatamente en las proteínas discretas sin la necesidad de ninguna actividad de escisión externa.

Se conocen varios sitios de autoescisión, incluyendo el virus de la fiebre aftosa (FMDV) y el péptido de autoescisión 2a.

La secuencia de coexpresión puede ser una secuencia interna de entrada del ribosoma (IRES). La secuencia de coexpresión puede ser un promotor interno.

VECTORES

En un aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico o constructo de ácido nucleico de la invención.

Dicho vector se puede utilizar para introducir la(s) secuencia(s) de ácido nucleico o lo(s) constructo(s) de ácido nucleico en una célula huésped de modo que exprese uno o más CrGFR(s) de acuerdo con el primer aspecto de la invención y, opcionalmente, una o más otras proteínas de interés (POI), por ejemplo, un TCR o un CAR.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, tal como un vector retroviral o un vector lentiviral, o un vector basado en transposones o ARNm sintético. Los vectores derivados de retrovirus, como el lentivirus, son herramientas adecuadas para lograr la transferencia de genes a largo plazo ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén o transgenes y su propagación en células hijas.

El vector puede ser capaz de transfectar o transducir un linfocito, incluyendo una célula T o una célula NK.

La presente invención también proporciona vectores en los que se inserta un ácido nucleico de la presente invención.

La expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican un CrGFR y, opcionalmente, un TCR o CAR se consigue típicamente uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica CrGFR y el polipéptido TCR/CAR o porciones del mismo a uno o más promotores, e incorporando el constructo en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación y la integración en células eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traslación, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular, ver también WO 01/96584; WO 01/29058; y la patente de EE.UU. No 6,326,193).

En algunas modalidades, los constructos de ácido nucleico son como se muestran en las figuras de este documento. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos son constructos multicistronicos que permiten la expresión de múltiples transgenes (por ejemplo, CrGFR y un TCR y/o CAR, etc.) bajo el control de un único promotor. En algunas modalidades, los transgenes (por ejemplo, CrGFR y TCR y/o CAR, etc.) están separados por un péptido 2A que

se autoescinde. Los ejemplos de péptidos 2A útiles en los constructos de ácido nucleico de la invención incluyen F2A, P2A, T2A y E2A. En otras modalidades de la invención, el constructo de ácido nucleico de la invención es un constructo multicistrónico que comprende dos promotores; un promotor impulsa la expresión de CrGFR y el otro promotor impulsa la expresión del TCR o CAR. En algunas modalidades, los constructos de promotor dual de la invención son unidireccionales. En otras modalidades, los constructos de promotor dual de la invención son bidireccionales.

Para evaluar la expresión del polipéptido CrGFR o porciones del mismo, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen reportero o ambos para facilitar la identificación y selección de las células de expresión de la población de células que se busca transfectar o transducir a través de vectores virales. El polipéptido CrGFR puede incorporar un marcador, como CD34, como parte del dominio EC.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene un vector o una célula que expresa CrGFR de la invención junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.

MÉTODO DE TRATAMIENTO

Las células, que incluyen las células T y NK, que expresan CrGFRs para su uso en los métodos de la presente invención pueden crearse ex vivo a partir de la propia sangre periférica del paciente (autóloga) o en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre periférica de un donante o sangre periférica de un donante no conectado (allogénico). Alternativamente, las células T o las células NK pueden derivarse de diferenciación ex vivo de células progenitoras inducibles o células progenitoras embrionarias a células T o células NK. En estos casos, las células T que expresan un CrGFR y, opcionalmente, un CAR y/o TCR, se generan mediante la introducción de ADN o ARN que codifica el CrGFR y, opcionalmente, un CAR y/o TCR, por uno de los muchos medios que incluyen la transducción. con un vector viral, transfección con ADN o ARN.

Células T o NK que expresan un CrGFR de la presente invención y, opcionalmente, que expresan un TCR y/o CAR pueden usarse para el tratamiento de cánceres hemotológicos o tumores sólidos.

Un método para el tratamiento de una enfermedad se refiere al uso terapéutico de un vector o célula, que incluye una célula T o NK, de la invención. A este respecto, el vector o las células T o NK pueden administrarse a un sujeto que tenga una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar por lo menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o para ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad. El método

de la invención puede provocar o promover la muerte de células cancerosas mediada por células T.

El vector, o las células T o NK de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un paciente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Uno o más agentes terapéuticos adicionales puede coadministrarse al paciente. Por "coadministración" se entiende administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales y el vector, o las células T o NK de la presente invención lo suficientemente cerca en el tiempo para que el vector, o las células T o NK puedan potenciar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales, o viceversa. A este respecto, los vectores o las células se pueden administrar primero y se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales segundo, o viceversa. Alternativamente, los vectores o células y uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar simultáneamente. Los agentes terapéuticos adecuados que pueden coadministrarse con los vectores o células de la presente invención incluyen cualquier agonista del receptor del factor de crecimiento que active el CrGFR, por ejemplo, Eltrombopag (rINN, nombre en código SB-497115-GR) Lusutrombopag y Avatrombopag o Romiplostim.

El Eltrombopag puede ser particularmente útil en los métodos de la invención ya que se conoce su perfil de toxicidad. En estudios preclínicos, se demostró que el compuesto interactúa selectivamente con el receptor de trombopoyetina, lo que conduce a la activación de la vía de señalización JAK-STAT y al aumento de la proliferación y diferenciación de megacariocitos. Los

estudios en animales confirmaron que la administración podría aumentar el recuento de plaquetas. En 73 voluntarios sanos, dosis más altas de Eltrombopag causaron mayores aumentos en el número de plaquetas circulantes sin problemas de tolerabilidad, ver, por ejemplo, Jenkins JM, Williams D, Deng Y, Uhl J, Kitchen V, Collins D, Erickson-Miller CL (Junio de 2007). "Estudio clínico de fase 1 de eltrombopag, un agonista oral del receptor de trombopoyetina no péptido". Blood 109 (11): 4739-41. Por lo tanto, en los métodos de la invención pueden determinarse dosis adecuadas de Eltrombopag basándose en estudios clínicos publicados previamente y los ensayos in vitro descritos en el presente documento.

Otro agente que puede resultar útil es la IL-2, ya que se utiliza actualmente en terapias celulares existentes para potenciar la actividad de las células administradas. Sin embargo, como se indicó anteriormente, el tratamiento con IL-2 está asociado con problemas de toxicidad y tolerabilidad. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es estimular la proliferación celular utilizando un agonista que se una al CrGFR y, por lo tanto, reduzca la cantidad de IL-2 que debe administrarse (por ejemplo, a niveles que sean menos tóxicos) o incluso eliminar la necesidad de administración de IL-2.

Para los fines de los métodos inventivos, en los que se administran células al paciente, las células pueden ser células alogénicas o autólogas al paciente.

Varios aspectos y modalidades adicionales de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la vista de la presente divulgación.

Todos los documentos mencionados en esta descripción se incorporan aquí como referencia en su totalidad

"y/o" cuando se usa en este documento se debe tomar como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se estableciera individualmente en el presente documento.

A menos que el contexto indique lo contrario, las descripciones y definiciones de las características establecidas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o modalidad particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y modalidades que se describen.

Ciertos aspectos y modalidades de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente y las tablas descritas a continuación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Producción y evaluación de células T que expresan CrGFR

Materiales y Métodos

Plásmidos

El plásmido pSF.Lenti.EF1a fue generado por Oxford Genetics reemplazando el promotor CMV existente en pSF.Lenti.CMV.PGK.puro con el promotor 1 α del factor de elongación (EF) para generar pSF.Lenti.EF1 α .PGK.puro. A continuación, se eliminó el segmento PGK.Puro y se clonaron los constructos TpoR a través de una digestión XbaI/NheI con el sitio NheI corriente abajo del gen de resistencia a puromicina. Los plásmidos de empaquetamiento pVSVg, pCgpV y pRSV.Rev (sistema de empaquetamiento ViraSafe Lentiviral - Pantropic) se obtuvieron de Cell Biolabs (VPK-206).

Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de los siguientes fabricantes:
Abcam - DRAQ7 (AB109202-1ml)

Miltenyi Biotec anti-Melanoma (MCSP)-PE (130-099-413); anti-CD34-APC (130-090-954), anti-CD45-FITC (130-080-202), anti-CD71-APC (130-099-239), anti-CD110-PE

BD Biosciences: anti-CD34-PE (555822);

E-Biosciences: Tinte de Viabilidad Fijable eFlor 450 (65-0863-18), Tinte de Viabilidad Fijable eFlor 780 (65-0865-18),

Líneas celulares

La línea celular Jurkat E6.1 y la línea celular Ba/F3 se cultivaron en RPMI suplementado con FCS al 10% (F9665-500ml: Sigma), HEPES 1M al 1% (H0887-100ml) y penicilina/estreptomicina al 1% (P0781-100ml) (Medios de células T: TCM). La línea celular 293T y se cultivó de forma rutinaria en DMEM suplementado con FCS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% (P0781-100 ml) (D10).

Aislamiento de células T

Las células T se aislaron de PBMC de capas leucocíticas. En resumen, se obtuvieron capas leucocíticas de NHSBT y se aislaron PBMC mediante centrifugación de densidad mediada por Ficoll. Las células T intactas se aislaron usando perlas paramagnéticas (ver más abajo). Se cultivaron células T en RPMI suplementado con FCS al 10% (F9665-500ml: Sigma), HEPES 1M al 1% (H0887-100ml) y Penicilina/estreptomicina (P0781-100ml) (medio de células T: TCM).

Producción de lentivirus

6×10^6 células 293T se sembraron en 10 ml D10 el día antes de la transfección en un matraz T75 recubierto de poli-d-lisina (Greiner). El día de la transfección, se preparó DMEM libre de suero tamponado con HEPES 0.025 M (pH 7.1) y D10 tamponado con HEPES 0.025 M (pH 7.9). 1.5 ml de mezclas de

transfección por matraz utilizando 10 µg de plásmido de transferencia lentiviral (pSF.Lenti) y 10 µg de cada uno de pVSVg, pCgpV y pRSV.Rev y CaCl₂ hasta una concentración final de 0.05 M en medios de pH 7.1. Se dejó que se formaran complejos de transfección durante 30 minutos antes de añadirlos gota a gota a los matraces que contenían 6 ml de medio a pH 7.9. 24 horas más tarde, el medio se cambió por 10 ml de D10 reciente. 24 y 48 horas después, se recogió el medio, se combinó y se concentró usando el concentrador Lenti-X (Clontech-Takara: 631232). Las partículas lentivirales concentradas se resuspendieron a 10 veces el volumen de sobrenadante original y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Transducción de células T

Se añadieron 1×10^5 células T por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se centrifugó la placa y se aspiró el sobrenadante antes de añadir 50-100 µl de sobrenadante lentiviral suplementado con 4 µg/ml de Polibreno (bromuro de hexadimetrina - Sigma: H9268-5G) e IL-2 en la concentración indicada. En algunos casos se agregaron reactivos de activación: Dynabeads™ Human T Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher: 11131D), Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28/CD137 (Thermo Fisher 11162D) en las concentraciones recomendadas por el fabricante.

Clases de perlas paramagnéticas

Los tipos de perlas paramagnéticas se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando microperlas anti-PE (Miltenyi Biotec o StemCell Technologies), o microperlas de aislamiento de células T (17951: StemCell Technologies).

Protocolo de expansión rápida (REP)

Las células T se expandieron usando alimentadores de capa leucocitaria irradiados. En resumen, se aplicaron 10 capas leucocíticas irradiadas obtenidas de NHSBT, las PBMC se aislaron por centrifugación de densidad mediada por Ficoll, se mezclaron y se crioconservaron. Los alimentadores de capa leucocitaria descongelados se mezclaron con células T en una proporción 1:20 - 1:100 a una concentración final de células de 1×10^6 / ml en TCM + 200 IU/ml de IL-2 y 1 μ g/ml de fitohemaglutinina en un matraz de cultivo T25. El matraz vertical se colocó en un ángulo de 45° durante los primeros cinco días, después de lo cual se volvió a colocar el matraz en posición vertical y se cambió el medio por medio de intercambio de medios. Los intercambios de medios se realizaron cada 2-3 días con IL-2 fresca añadida a una concentración final de 200 IU/ml durante 14 días, después de lo cual las células se crioconservaron o se pusieron directamente en ensayo.

Diseño de constructo

Previamente hemos validado que el TpoR puede tener actividad en células T humanas primarias. Sin embargo, los intentos de modificar el receptor

no siempre fueron sencillos. Por ejemplo, las fusiones entre el dominio TpoR Ec y el dominio GeSF IC no se expresaron en la superficie celular. Además, las fusiones del receptor de prolactina no parecían ser completamente estables en la superficie. Además, sentimos que podríamos mejorar la capacidad de señalización de los receptores basados en TpoR en las células T al incluir componentes de señalización que activan a JAK3, una molécula de señalización involucrada en la señalización de IL-2 pero no en la señalización de TpoR y, por lo tanto, es más probable que impulse la IL-2 como señales en células diseñadas.

Por lo tanto, nos propusimos generar receptores de fusión en los que se fusionaran dominios adicionales directamente al extremo C del dominio TpoR IC. Primero generamos una fusión entre TpoR y el dominio de señalización IL2r β . Los intentos anteriores de generar fusiones entre TpoR e IL2r β mediante la eliminación completa del dominio intracelular de TpoR dieron como resultado receptores que no se expresaban suficientemente bien. Por lo tanto, adoptamos un enfoque alternativo en el que un dominio de señalización TpoR-IL2r β híbrido se creó mediante el cual la región de señalización IL2r β se fusionó en el extremo N o extremo C con el dominio de señalización TpoR. A continuación, generamos receptores donde el dominio citoplásmico de TIAF1, TLR1, CD150, IL2r γ , CD40, LMP1 e ITAM1 de eD3 ζ se fusionaron del extremo C con el dominio de señalización TpoR. El motivo de la elección de estos receptores fue el siguiente: TIAF1 - Existe evidencia de que TIAF1 se une a JAK3 (Ji et al. 2000); TLR1/CD40 – Se ha demostrado que la sinergia entre TLRs y CD40 induce la expansión de células T (Ahonen et al. 2004), además,

se ha demostrado que CD40 se une a JAK3 y requiere JAK3 para la señalización en células B (Hanissian & Geha 1997); CD150 - Existe evidencia de que CD150 puede proteger a las células T de la privación de IL-2 (Aversa et al. 1997); ITAM1 - Decidimos fusionar un solo ITAM de CD3 ζ en el extremo C de TpoR en un esfuerzo por inducir una respuesta mitogénica; LMP1 - LMP1 del virus EBV ha demostrado interactuar con JAK3 (Gires et al. 1999), además, también fusionamos LMP1 directamente con el dominio transmembrana de TpoR ya que sentimos que la fusión del dominio citoplasmático de TpoR sería bastante grande y podría no expresarse suficientemente bien. También generamos CrGFR que consiste en un dominio extracelular y transmembrana de TpoR fusionado al dominio citoplásmico de CD28 y CD137 ya que sentimos que estos proporcionarían una señal de crecimiento coestimulante tras la administración de Eltrombopag, las secuencias de estos constructos se proporcionan a continuación.

Los constructos se clonaron en pSF.Lenti (Oxford Genetics) a través de un sitio XbaI y NheI. Todos los fragmentos y constructos fueron optimizados por codones, sintetizados genéticamente y clonados por Genewiz.

Producción Lentiviral: La producción lentiviral se realizó utilizando un sistema de empaquetamiento de tres plásmidos (Cell Biolabs, San Diego, USA) mezclando 10 μ g de cada plásmido, más 10 μ g del plásmido lentiviral pSF.Lenti que contiene el transgén, junto en RPMI libre de suero que contiene CaCl₂ 50 mM. La mezcla se añadió gota a gota a una monocapa confluyente al 50% de células 293T en matraces de 75 cm². Los sobrenadantes virales se

recogieron a las 48 y 72 horas después de la transfección, se combinaron y se concentraron usando la solución de concentración de sobrenadante lentiviral LentiPac (GeneCopoeia, Rockville, Maryland, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes lentivirales se concentraron 10 veces y se usaron para infectar directamente las células T humanas primarias en presencia de polibreno 4 µg/ml (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido).

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos normales antes de la activación durante 24 horas con perlas de expansión y activación de células T (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante antes de la adición de sobrenadantes lentivirales.

Después de la expansión, las células se lavaron excesivamente para eliminar cualquier IL2 exógena y se sembraron en placas con fondo en U de 96 pocillos. Las células se suplementaron con IL2 (Proleukin) o Eltrombopag (Stratech Scientific, Suffolk, Reino Unido). A partir de entonces, en varios puntos de tiempo, las células se tiñeron con una dilución 1:400 de tinte de viabilidad fijable eFlor-450 (eBioscience, UK) y se contaron directamente desde los pocillos usando un Citómetro MACSQuant, o se tiñeron con colorante de viabilidad DRAQ7 más anticuerpos anti-CD110 conjugados con ficoeritrina (Miltenyi Biotec, Reino Unido) y se analizaron usando un citómetro MACSQuant. Luego se analizó la viabilidad celular y/o el nivel de transducción utilizando el software MACSQuantify (Miltenyi Biotec, Reino Unido).

RESULTADOS

Inicialmente probamos la funcionalidad y los perfiles de expresión del CrGFR en comparación con el receptor wt en células Jurkat E6.1 y Ba/F3 que son linfoma de células T humanas y líneas de células B murinas dependientes de IL-3, respectivamente. Aunque Ba/F3 no son humanas o células T, por lo menos mostrarían si los receptores pueden plegarse y expresarse correctamente, y si son capaces de transmitir una señal. Se fabricaron y utilizaron partículas lentivirales para infectar directamente Jurkat E6.1 y células Ba/F3. Las células Jurkat se analizaron después de 48 horas para determinar la expresión mediante el uso de un anticuerpo anti-CD110 conjugado con PE. Se incubaron células Ba/F3 con Eltrombopag o IL-3 murina y se evaluó la expresión del CrGFR durante un número de días mediante análisis de la expresión de CD110 mediante citometría de flujo. Como muestra la Figura 4, todos los receptores podrían detectarse con éxito en las células Jurkat E6.1, aunque tres receptores (TpoR.SLAM, TpoR.TIAF1 y TpoR.IL2r β -cyt.TpoR-cyt) tenían un perfil de expresión bajo que sugiere que no se expresan particularmente bien en la superficie. En las células Ba/F3, todos los receptores se expresaron y podrían enriquecerse en la población mediante la adición de Eltrombopag pero no IL-3 como se predijo (Figura 5). Sin embargo, los dos receptores de fusión IL2r β , aunque podían enriquecerse en la población, tenían un perfil de supervivencia pobre en Ba/F3 y el ensayo tuvo que interrumpirse con estos receptores debido a la falta de células viables.

A continuación, tomamos estos receptores y los expresamos en células T humanas primarias y expusimos estas células a IL-2 o Eltrombopag. Se aislaron tres poblaciones de células T humanas primarias de donantes a partir

de capas leucocíticas y se transdujeron con los constructos lentivirales indicados en presencia de CD3/CD28 Dynabeads. Después de la expansión, las células se incubaron con IL-2 o Eltrombopag. Los resultados se muestran en las Figuras 6, 7 y 8 (x3 donantes). Vimos un aumento en la expansión / supervivencia de las células T con algunos de los receptores en algunos de los donantes. Analizamos este conjunto de datos en general al observar la proporción de células que expresan una buena proporción de células viables con una población distinta de células CD110+ después de 21 días. Esto redujo nuestro panel de receptores para analizar más a fondo: TpoR.CD40, TpOR.IL2ry, TpoR.ITAM1, TpOR.LMP1-cyt y TpoR.TpoR-cyt-LMP1-cyt. TpoR.Δ60 también se veían bien, pero no perseguimos esto inicialmente con la idea de que esto podría ser posteriormente incorporado en receptores de fusión de generaciones posteriores.

A continuación, repetimos el experimento pero clasificamos las células CrGFR+ usando selección de CD110+ mediante selección de perlas paramagnéticas usando los receptores identificados en la primera ronda de selecciones (Figuras 10, 11 y 12). Observamos una mayor supervivencia de las células T injertadas con la mayoría del CrGFR en los tres donantes. En particular, vimos la expansión de las células WT-TpoR, TpOR.CD40, TpOR.IL2ry y TpoR.LMP1-cyto en el segundo donante (Figura 12) por encima con medios solos.

A continuación, evaluamos la capacidad de estos receptores para promover la supervivencia / expansión en un modelo de terapia celular adoptiva

mediante el diseño de linfocitos infiltrantes de tumores. TIL del paciente TIL042 (Melanoma uveal) se diseñaron con la variante o wt CrGFR y se mezclaron con células tumorales compatibles con el paciente (CTUM42.1). En los días 4 y 7 se realizaron recuentos de las células totales así como de las células CD110+. Encontramos una disminución inicial en el número de células, probablemente impulsada por AICD o factores inhibidores intrínsecos. Sin embargo, entre los días 4 y 7 observamos un aumento en el número de células CD110+ con todos los receptores probados con Eltrombopag o Eltrombopag + bajo dosis de IL-2. El efecto del TpoR.CD40 en particular fue alentador ya que no demostró ningún enriquecimiento no específico en IL2 solo, un efecto observado con los otros receptores probados.

Se evaluó además el efecto del CrGFR en ovario TIL. Se diseñaron tres poblaciones de TIL de ovario para expresar los receptores variantes WT o TpoR.CD40, TpoR.IL2ry o TpoR.LMP1-Cyt y se mezclaron con células tumorales compatibles con el paciente en presencia o ausencia de Eltrombopag. Se realizaron recuentos del total y de células CD110+ después de 4 y 7 días. Observamos una expansión específica de las células CrGFR+ en presencia de tumor entre los días 4 y 7 en los donantes 2 y 3 con todos los receptores excepto el TpoR.LMP1.cyt. En el donante 1 encontramos que aunque no hubo expansión específica de las células CrGFR+, la adición de Eltrombopag pareció proteger a las células del AICD (muerte celular inducida por activación). Es importante mencionar que encontramos que en todos los tres donantes, la actividad de las variantes TpoR.IL2ry y TpoR.CD40 fue superior a la del receptor WT (Figura 13).

Finalmente, validamos el potencial de señalización del nuevo CrGFR mediante la realización de análisis fosfo STAT tras el tratamiento de células T que expresan CrGFR con medios, citocina o fármaco. Con esta finalidad, las células T de 4 donantes se transdujeron con wt TpoR, TpoR. CD40 o TpoR.IL2ry, enriquecido para la expresión de CrGFR usando protocolos de selección de perlas paramagnéticas y luego expandido usando estimulación policlonal. Las células se trataron durante cuatro horas con medios solos (RPMI), IL-2, Tpo o Eltrombopag (Elt) antes de la fijación con metanol, la permeabilización y el análisis usando anticuerpos específicos de pSTAT. Las moléculas STAT son los impulsores clave de la señalización celular con la activación de citocinas de las células, pSTAT5 en particular, es clave para la actividad de IL-2. De hecho, vimos la inducción de pSTAT5 con IL-2 pero no la incubación con medios. La IL-12 como control no puede inducir la activación de STAT5 como se observa en este experimento. Tpo y Eltrombopag en particular mostraron inducción de actividad STAT5. Esto se vio más claramente con el TpoR.IL2ry CrGFR que demuestra una clara activación de la vía de activación de STAT5 correcta cuando se estimula con Eltrombopag.

CONCLUSIÓN

Los receptores del factor de crecimiento que responden a los fármacos disponibles clínicamente pueden transferirse a las células T mediante tecnología de transferencia de genes y, por tanto, mantienen su capacidad funcional para suministrar señales de crecimiento / supervivencia celular. Es importante destacar que, como ejemplo, las células T humanas primarias

injertadas con CrGFR basadas en TpoR responden al fármaco clínicamente disponible Eltrombopag y se expanden y sobreviven en ausencia de IL-2 que normalmente se requiere para un crecimiento óptimo de las células T.

Aquí probamos una serie de variantes funcionales; en base a TpoR fusionado a los dominios de señalización de una serie de moléculas coestimuladoras o de señalización conjunta u otros receptores del factor de crecimiento. Hemos demostrado que estos receptores confieren crecimiento y supervivencia independientes de IL-2 en células T humanas primarias y Linfocitos Infiltrantes de Tumores en presencia del agonista de TpoR Eltrombopag. En particular, encontramos que un CrGFR de fusión de TpoR.CD40 confiere una supervivencia / expansión de TIL mediada por Eltrombopag muy específica y muestra una actividad óptima en las células T humanas primarias.

Los aspectos y modalidades de la invención también se exponen en las siguientes cláusulas:

1. Una célula T o NK que comprende un receptor del factor de crecimiento recombinante quimérico (CrGFR) que comprende:
 - (i) un dominio extracelular (EC);
 - (ii) un dominio transmembrana (TM) de trombopoyetina; y
 - (iii) un dominio intracelular (IC) del receptor del factor de crecimiento quimérico.

2. La célula T o NK de acuerdo con la cláusula 1, en la que la unión de un ligando al CrGFR induce la proliferación de la célula T o NK.
3. La célula T o NK de acuerdo con la cláusula 2, en la que el ligando es trombopoyetina humana, una agonista del receptor de trombopoyetina, o un antígeno asociado a tumor.
4. La célula T o NK de acuerdo con la cláusula 3, en la que el agonista del receptor de trombopoyetina se une al dominio TM.
5. La célula T o NK de acuerdo con la cláusula 3 o la cláusula 4, en la que el agonista del receptor de trombopoyetina se selecciona de Eltrombopag y Romiplostim.
6. La célula T o NK de acuerdo con las cláusulas anteriores en la que el dominio EC comprende el dominio EC c-mpl humano.
7. La célula T o NK de acuerdo con las cláusulas anteriores, en la que el dominio EC comprende uno o más de i) un dominio EC truncado, ii) un dominio EC c-mpl truncado, iii) un dominio que se une a un antígeno asociado a un tumor, iv) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un tumor asociado a antígeno; y v) un marcador de selección.
8. La célula T o NK de acuerdo con las cláusulas anteriores, en la que el dominio IC comprende un dominio coestimulador, coinhibidor o de señalización

conjunta derivado de cualquier molécula coestimuladora, coinhibitoria o de señalización conjunta como, pero sin limitarse a, CD2, CD27, CD28, CD29, CD134, CD137, CD150, PD1, etc.

9. La célula T o NK de acuerdo con las cláusulas anteriores, en la que el primer dominio IC se selecciona de: receptor de hormona de crecimiento humana, receptor de prolactina humana, receptor de trombopoyetina humana (c-mpl), receptor de G-CSF o receptor de GM-CSF.

10. La célula T o NK de acuerdo con las cláusulas anteriores en la que el dominio IC adicional se selecciona de receptor de hormona de crecimiento humana, receptor de prolactina humana, receptor de trombopoyetina (c-mpl), receptor de GM-CSF o receptor de GM-CSF, o un receptor coestimulador o de señalización conjunta. Además, el dominio IC también comprende un segundo dominio derivado de uno de los siguientes (pero no limitado a): dominios de señalización del receptor de citocinas (por ejemplo, receptor de IL2), dominios de señalización conjunta (por ejemplo, CD40), proteínas oncogénicas virales (por ejemplo, LMP1), dominios coestimuladores (por ejemplo, CD28, CD137, CD150, etc.) u otros dominios mitógenos (por ejemplo, receptores tipo Toll, motivos de activación basados en tirosina inmunorreceptores, dominios de señalización de CD3, etc.). Este segundo dominio se fusiona directamente, o mediante un dominio enlazador, al terminal C o N del dominio TpoR IC.

10. La célula T o N K de acuerdo con las cláusulas anteriores que tiene el dominio TM del receptor de trombopoyetina humano o una variante del mismo

que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia que se une a la trombopoyetina humana o un agonista del receptor de trombopoyetina.

11. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 3 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

12. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 4 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

13. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 5 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

14. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 6 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

15. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 7 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

16. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 8 o una variante de la misma que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

17. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 9 o una variante de la misma que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79

aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

18. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 10 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C en hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

19. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 11 o una variante de la misma que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

20. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 12 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con el dominio TpoR IC truncado en el extremo C por hasta 79 aminoácidos, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

21. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 13 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

22. La célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en la que el CrGFR comprende la secuencia mostrada como SEC ID No. 14 o una variante de la misma que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia a nivel de proteína, o con un dominio EC alternativo que mantiene la capacidad de responder a un fármaco agonista sintético como Eltrombopag,

23. Una célula T o NK de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, que comprende la secuencia mostrada en cualquiera de las SEC ID No. 3 a 14, o una variante de la misma que tenga por lo menos un 80% de identidad de secuencia pero que conserve la capacidad de i) unirse a la trombopoyetina humana, o un agonista del receptor de trombopoyetina humana; e ii) inducir la proliferación o supervivencia celular

24. La célula T o célula NK de acuerdo con cualquier cláusula anterior que se une a Eltrombopag.

25. La célula T o célula NK de acuerdo con cualquier cláusula anterior en la que la célula T se selecciona de una Linfocito Infiltrante de Tumor (TIL) una Célula Reguladora T (Treg) o una célula T primaria.

26. La célula T o célula NK de acuerdo con cualquier cláusula anterior que además comprende un receptor de célula T recombinante (TCR) y/o Receptor de Antígeno Quimérico (CAR).

27. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el CrGFR como se define en cualquier reivindicación anterior.

28. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la cláusula 27 que comprende la secuencia que se muestra como SEC ID No. 17 a 28 o una variante de la misma que no altera la secuencia de la proteína traducida

29 - Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la cláusula 27 que comprende las secuencias que se muestran en SEC ID 3-12 pero con el dominio IC mostrado en SEC ID No. 2.

30. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la cláusula 27-29, o cualquier variante de la misma que no altera la secuencia de la proteína traducida.

31. Un método para producir una célula T o una célula NK de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-26, que comprende la etapa de introducir un ácido nucleico de acuerdo con la cláusula 27-29, o un vector de acuerdo con la cláusula 19-28, en una célula T o una célula NK.

32. Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con la cláusula 30 o una célula T o NK de acuerdo con las cláusulas 1-26, junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

33. Un método de expansión celular in vivo que comprende administrar las células de las cláusulas 1-26 o la composición farmacéutica de la cláusula 32 a un sujeto.

34. Un método de expansión celular in vivo de acuerdo con la cláusula 33 que comprende administrar trombopoyetina, o un agonista del receptor de trombopoyetina, tal como Eltrombopag o Romiplostim, a un sujeto.

35. Una celda T o NK de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-26, o vector de acuerdo con la cláusula 30, para uso en terapia celular adoptiva.

36. Una célula T o NK de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-26, o un vector de acuerdo con la cláusula 30, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

37. Un método para tratar el cáncer que comprende la etapa de administrar la célula T o la célula NK de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-26 a un sujeto.

38. El uso de un vector de acuerdo con la cláusula 30 o la célula T o NK de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-26 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

39. Eltrombopag para uso en terapia celular adoptiva.

40. Eltrombopag para uso en la expansión in vitro o in vivo de células T o NK de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-26.

41. Una composición que comprende una célula T o N K de acuerdo con las cláusulas 1 a 26 para su uso en combinación con trombopoyetina o un agonista del receptor de trombopoyetina en el tratamiento de un cáncer.

Referencias

Ahonen CL, Doxsee CL, McGurran SM, Riter TR, Wade WF, Barth RJ, Vasilakos JP, Noelle RJ, Kiedl RM. J Exp Med. 15 de marzo de 2004; 199(6): 775-84. La activación combinada de TLR y CD40 induce una potente expansión de células T CD8+ con dependencia variable en el tipo I IFN.

Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. J Immunol. 1 de mayo de 1997; 158(9):4036-44. El compromiso de la molécula de activación linfocítica de señalización (SLAM) en las células T activadas da como resultado la proliferación de células T sensibles a ciclosporina A independientes de IL-2 y la producción de IFN-gamma.

Columbyova L, Loda M, Scadden DT. Cancer Res. 15 de agosto de 1995; 55(16):3509-12. Expresión del receptor de trombopoyetina en líneas celulares de cáncer humano y tejidos primarios.

Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. N Engl J Med. 18 de abril de 2013; 368(16):1509-18. Células T modificadas con receptor de antígeno quimérico para la leucemia linfocítica aguda.

Erickson-Miller CL, Delorme E, Tian SS, Hopson CB, Landis AJ, Valoret EI, Sellers TS, Rosen J, Miller SG, Luengo JI, Duffy KJ, Jenkins JM. Células madre. Febrero de 2009; 27(2):424-30. Actividad preclínica de eltrombopag (SB-497115), un agonista del receptor de trombopoyetina no peptídico oral.

Fox NE, Lim J, Chen R, Geddis AE. Exp Hematol. Mayo de 2010; 38(5):384-91. F104S c-Mpl responde a un agonista del receptor de trombopoyetina que se une al dominio transmembrana: prueba del concepto de que las mutaciones seleccionadas del receptor en la trombocitopenia amegacariocítica congénita pueden ser estimuladas con agentes trombopoyéticos alternativos.

Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, Baumann M, Kieser A, Kaiser C, Zeidler R, Scheffer B, Ueffing M, Hammerschmidt W. EMBO J. 1 de junio de 1999; 18(11): 3064-73. La proteína de membrana latente 1 del virus de Epstein-Barr interactúa con JAK3 y activa las proteínas STAT.

Hanissian SH, Geha RS. Inmunidad. Abril de 1997; 6(4):379-87. Jak3 está asociado con CD40 y es crítico para la inducción de CD40 de la expresión génica en células B.

Kawahara M, Kimura H, Ueda H, Nagamune T. Biochem Biophys Res Commun. 27 de febrero de 2004; 315(1):132-8. Selección de población de células modificadas genéticamente utilizando quimera de receptor / anticuerpo específico de hapteno.

Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Kranick SM, Nath A, Nathan DA, Morton KE, Toomey MA, Rosenberg SA. J Clin Oncol. 2015 33(6):540-9. El linfoma difuso de células B grandes refractario a la quimioterapia y las neoplasias malignas de células B indolentes se pueden tratar eficazmente con células T autólogas que expresan un receptor de antígeno quimérico anti-CD19.

Jin L, Zeng H, Chien S, Otto KG, Richard RE, Emery DW, Blau CA. Nat Genet. Setiembre de 2000; 26(1):64-6. Selección in vivo usando un interruptor de crecimiento celular.

Ji H, Zhai Q, Zhu J, Yan M, Sun L, Liu X, Zheng Z. Una nueva proteína MAJN se une a Jak3 e inhibe la apoptosis inducida por la privación de IL-2. Biochem Biophys Res Commun. 2 de abril de 2000; 270(1):267-71.

Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T. Cytokine. Setiembre de 2011; 55(3):402-8. Promoción del crecimiento de progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente utilizando una quimera anticuerpo / c-Mpl.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula EE. UU., Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Science. 6 de octubre de 2006; 314(5796):126-9. Regresión del cáncer en pacientes después de la transferencia de linfocitos modificados genéticamente.

Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. J Gene Med. Enero de 2004; 6(1):22-31. Expansión in vivo de células hematopoyéticas modificadas genéticamente mediante un nuevo gen amplificador selectivo que utiliza el receptor de eritropoyetina como interruptor molecular.

Nishimura CD, Brenner DA, Mukherjee M, Hirsch RA, Ott L, Wu MF, Liu H, Dakhova O, Orange JS, Brenner MK, Lin CY, Arber C. Blood. 21 de diciembre de 2017; 130(25):2739-2749. c-MPL proporciona células T transgénicas para receptores de células T dirigidas a tumores con señales de coestimulación y citocinas.

Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK,

Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. Nat Med. Agosto de 2015; 21(8):914-21. Las células T diseñadas por TCR específicas de NY-ESO-1 median los efectos antitumorales sostenidos específicos de antígeno en mieloma.

Richard RE, Wood B, Zeng H, Jin L, Papayannopoulou T, Blau CA. Blood. 15 de enero de 2000; 95(2):430-6. Expansión de células hematopoyéticas humanas primarias modificadas genéticamente utilizando inductores químicos de dimerización.

Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Clin Cancer Res. 1 de julio de 2011; 17(13):4550-7. Respuestas completas duraderas en pacientes con melanoma metastásico muy pretratados mediante inmunoterapia de transferencia de células T.

Saka K, Kawahara M, Teng J, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T. J Biotechnol. Diciembre de 2013; 168(4):659-65. Ingeniería de motivos de arriba hacia abajo de un receptor de citocinas para dirigir la expansión ex vivo de células madre hematopoyéticas.

Saka K, Kawahara M, Ueda H, Nagamune T. Biotechnol Bioeng. Junio de 2012; 109(6):1528-37. Activación de transductores de señales diana que utilizan receptores quiméricos con motivos de unión a moléculas de señalización.

Yamane N, Tanaka Y, Ohyabu N, Yamane S, Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H. Eur J Pharmacol. 31 de mayo de 2008; 586(1-3):44-51. Caracterización de nuevos no-péptidos miméticos de trombopoyetina, su especificidad de especie y el mecanismo de activación del receptor de trombopoyetina.

SECUENCIAS

En las secuencias de aminoácidos siguientes, la negrita indica la secuencia derivada de TpoR.

En las secuencias de nucleótidos a continuación, las bases degeneradas se indican utilizando el código IUPAC estándar:

Código de nucleótido IUPAC	Base	Código de nucleótido IUPAC	Base
A	Adenina	K	G o T
C	Citosina	M	A o C
G	Guanina	B	C o G o T

T (o U)	Timina (o Uracilo)	D	A o G o T
R	A o G	H	A o C o T
Y	C o T	V	A o C o G
S	G o C	N	cualquier base
W	A o T	o -	espacio

** denota codones de parada.

Dominio transmembrana subrayado (en SEC ID Nos. 1 a 15)

SEC ID No. 1: TpoR tipo natural

635 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (negrita, cursiva): dominio citoplasmático TpoR.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPFISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTVDLPDGAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLGARGGTLELRPRSRYLRLRLRNLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLL***RWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
 ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
 CCTTHIANHSYLPLSYWQQP*******

SEC ID No. 15: TpoR tipo natural

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncnwsngaywsngarccnytnaartgytysnmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargargcn
 gcncnwsnggnacntaycarytnytnaycncntayccnmngaraarccnmngcngcnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytygggnacnmgtaygntgyccarttyccngaycargargargtnmgnynttytccnytncaayntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmgngtnytnytnyngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcnat
 gggnggnwsncarccnggngarytnarathwsntgggargarccngcncngarathwsngaytytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcncngaracntgytgyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncnwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacnatgccntggcargayggncnaarcara
 cnwsncnwsnmngngargcncnwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytggytnarytnmgngnwsngarccngayggngathwsnytnnggngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccnggngaygcngtnynggnytnacntgyttyacnytnayytnaaraaygnacntgyccngcncarccargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytaycaywsnmngcncnmgtgytgyccnmngaymgntayccnathtgggaraaytyg
 argargargaraaracnaayccnggnytnaracncncarttywsnmgtgycaytyaarwsnmgnaaygaywsnathath
 cayathyngtnargtnacnacngcncngnacngtnaywsntayytnngnwsncnttytggaathcaycargcngtnmg
 ytnccnacncnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytnarytnartggcarcayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytarytnmgntayacngngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnngngcncnmng
 gnggnacnytnarytnmgncnmngnwsnmgtaymgnytnarytnmgngcnytnayyggncnacntaycargg

ncntggwsnwsntggwsngayccnacnmngtnaracngcncngaracngcngtggaathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnytnynggnytnwsngcngtnytnnggnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgngnytnmgncaygc
 nytnnggcnwsnytnccngayytncaymngntnytnnggncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcn
 acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytn
 ntgywsnwsncargcncaratggaytaymgngnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngntgyccncn
 atggcngarwsngggnwsntgytyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggarccntrtrr

SEC ID N° 2: TpoR.Δ60

580 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales
 1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):
 dominio TpoR TM, 514-580 (negrita, cursiva): dominio citoplasmático TpoR con
 truncamiento de extremo C.

**MPSWALFMVTSCLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTEFLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPESDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGSWSLPVTVLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFFYHSRARCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLGARGGTLELRPSRYRLQLRLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTAHLVLGLSAVLGLLLL***RWQFPAHYRRLHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
 ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPL*******

SEC ID No. 16: TpoR. Δ60

atgccnwsntgggcnhtnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcnsngaywsngarccnytnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytytgggagargargcn
 gncncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytygggnacnmgtaygtntgyccarttyccngaycargargargtnmgnynttytyccnytncaaytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmgngtnytnytnyngaywsngtnggnytnccngcncncncnwsnathathargcnat
 gggngnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncncnagtnathcarytnathgcnacngaracntgytygngcnytn
 carmgncncaywsngcnsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnagntgcntggcargayggncnaarara
 cnwsncnwsnmngnargcnwsngcnytnacngcngargngnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytgytnarytnmgnsngarccngayggcnathwsnytnnggngnwsntgggngnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccngngaygcnngcnytnnggnytnartgytyacnytnaytnaaraaygtacntgyccartggcarcarcargay
 caygcnwsnwsncarggnttytytaylorwsnmngcncnmgtgytyccnmngngaymgntayccnathtgggaaaytggy
 argargargaraaracnaayccnggnytnaracncncarttywsnmgtgytyaarwsnmgnaaygaywsnathath
 cayathytngtngargtnacnacngcncngnagntncaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmg
 ytnccnaccnaaytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytnarytnartggcarcayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytaycarytnmgntayacngngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnnggncnmng
 gnggnacnytnarytnmgncnmngnwsnmgtaymgnytnarytnmgngcnytnaayggncnaccntaycargg
 nccntggwsnwsntggwsngayccnaccnmngntngaracngcncngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnytnnggnytnwsngcngtnytnnggnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgngnytnmgncaygc
 nytnngcncnwsnytnccngayytncaymngntnytnngncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcn
 acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytncnaarwsnwsngarmgnacncnytntrtrr

SEC ID No. 3: TpoR.TpoR-cyt.IL2rβ-cyt

626 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-538 (negrita, cursiva): dominio citoplasmático TpoR con

truncamiento de extremo C, 539-626 (sin formato): dominio citoplásmico IL2rβ.

MPSWALFMVTSCLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRSPREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTDLPDGAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFFYHSRARCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSFVWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPSRYRLQLRLRLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHAWPSLPDLHRVPRDWDQPPLGPPTPG
 VPDLVDFQPPPELVLRAGEEVPDAGPREGVSFPSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQ
 ELQGQDPTHLV**

SEC ID No. 17: TpoR.TpoR-cyt.IL2rβ-cyt

atgccnwsntgggcnhtnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraayyngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgaggaygargargcn
 gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygntayccnmgnaraarccnmngcngntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytytggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnttytccnytncayyntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttytgngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaaargcnat
 gggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncngarathwsngaytytnmgtaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncwsngcnytnaycarwsnccntgygcncarccnacntgcntggcargayggncnaarara
 cnwsnccnwsnmngargcncwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytgytncarytnmgnwsngarccngayggcnathwsnytnnggngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccnggngaygcngtnynggnytnartgytyacnytnayytnaaraaygtacntgycartggcarcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytytacywsnmngcncnmgtgytgyccnmngaymgtayccnathgggaaaytyg
 argargaraaracnaayccnggnytnaracncncarttywsnmgtgytgyttaaarsnmgnaaygaywsnathath
 cayathytnngargtnacnacngcncnggnacngtncaysntayytnngnwsnccnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacncnaayytncaytggmngarathwsnwsnggncayytngarytnartggcarcayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytacytnmgtayacnggngarggncaycargaytgaargtnytnarccncnytnnggncnmng
 gnggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgtaymgnytncarytnmngcncmgnytnaayggncnacntaycargg
 nccntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntgaracngcncngaracngcngtgathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnngtnynggnytnwsngcngtnynggnytnytnytnmgtggcarttyccngcncaytymgmngnytnmgncaaygc
 nytnngcncnwsnytnccngayytncaymngntccnmngaytgggayccncarccnytnnggncncnacncnggntn
 ccngayytnngtnaytytcarccncncngarytnytnmngargcnggngargargtnccngaycnggncnmngna
 rgngtnwsnttycctggwsnmgnccncnggncarggngartymngcnytnaaygcnmgnytncnytnaayacngay
 gntayytnwsnytnargarytnarggncargayccnacncayytngrtrr

SEC ID No. 4: TpoR.IL2rB-cyt.TpoR-cyt

808 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-709 (sin formato): dominio citoplásmico IL2rB , 710-808

(negrita, cursiva): dominio citoplásmico TpoR con truncamiento de extremo N.

MPSWALFMVTSCLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPESDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLNCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSS
 PFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFFHLP
 DALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLPLSGEDDAYCTFSPRDDLFLFPS
 LLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPSLLE/
 LPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPMAESGSCCTTHIANHSYPLSY
 WQQP**

SEC ID No. 18: TpoR.IL2rB-cyt.TpoR-cyt

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncnwsngaywsngarccnynnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggagargargcnc
 gcncnwsngngnacntaycarytnytnaygcntayccnmngngaraarccnmngcngtgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytygggnacnmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnnttytccnytncaaytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnytnyngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaaargcnat
 gggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncncngarathwsngaytytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnaengaracntgytgyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncnwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacntatgccntggcargayggncnaaraca
 cncnwsncnwsnmngngargcncnwsngcnytnacngcngargngggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytggtyncarytnmgntaycngaygggnathwsnytnnggngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccngngaygcngtngcnytnnggnytnartgytyacnytnayytnaaraaygtacntgycartggcarcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytaycaywsnmngcncmngntgytgyccnmngaymgntayccnathtgggaaaytgyg
 argargargaraaracnaayccnggnytnaracncncarttywsnmngntgycaytyaarwsnmngnaaygaywsnathath
 cayathytnngargtnacnacngcncngnacngtnacaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnt
 ytnccnacncnaayytncaytggmnggarathwsnwsnggncayytnngarytnngartggcarcayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytacytnmgntayacnggngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnnggngcncmngng
 gnggnacnytnngarytnmgntaymngntaymngnytnarytnmgngcncmngnytnaayggncnacntaycargg
 ncntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntgaracngnacngaracngcngtgathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnngtnynggnytnwsngcngtnytnnggnytnytnytnaaytgymgnaayacnggncntggtynaaraargtnytnaart
 gyaayacncngayccnwsnaarttytywsncarytnwsnwsngarccayggnggngaygtncaraartggtytnwsnwsncnc
 tycnwsnwsnwsnttywsncnggnggnytnngcncncngarathwsncncnytnngargtnytnngarmngngayaargtnacna
 rytnytnytnarccargayaargtnccngarccngcncnwsnytnwsnwsnaaycaywsnytnacnwsntgytyacnaaycargg
 ntaytytytycayytnccngaygcnytnngarathgargcngtgycargntaytyacntaygayccntaywsngargargayccng
 aygarggngtngcnggngcncnacngggnwsnwsncncarccnytnarccnytnwsnggngargaygaygcntaytygac
 nttyccnwsnmngngaygaytytnytnnttywsncncnwsnytnytnnggnggncnwsncncncnwsnacngcncnggngg
 nwsnggngcnggngargarmgnatgccncncnwsnytnarccngarmngntnytnngcncartayytnmgngayacngcngcny
 nwsncncncnaargcncacngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnngarathytnccnaarwsnwsngar
 mgnacncncnytnccnytnngywsnwsncargcncaratggaytaymngmngnytnarccnwsntgyytnngnacntatgccny
 tnwsngntgyccncncatggcngarwsngggnwsntgytyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntay
 tggcarcarcncntrtr

SEC ID No. 5: TpoR.SLAM

710 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (negrita): dominio extracelular de TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (negrita, cursiva): dominio citoplasmático TpoR,

636-710 (sin formato): dominio citoplasmático SLAM.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRSPREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTVLDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKSRNDSIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYPLSYWQQPRRRGKTNHYQTTVEKSLTIYAQVQKPGPLQKKLDSFPAQDP
 CTTIYAATEPVPESVQETNSITVYASVTLPESS**

SEC ID No. 19: TpoR.SLAM

atgccnwsntgggcnynttntatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncnwsngaywsngarccnytnaartgytysnmgnacnttygargaytnacntgyttytgggagargargargcn
 gncncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmgnagaraarccnmngcngntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytygggnacnmgnaygntntgyccarttyccngaycargargtnmgnytnttytccnytncaaytntgggthaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncncnwsnathathargcna
 gggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncncngarathwsngayttytnmgnaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncncnagtnathcarytnathgcnacngaraacntgytgyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncnwsngcnytnaycarwsnccntgygcncarccnacntatgccntggcargayggncncnara
 cncnwsnccnwsnmngngargcncnwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytggtyncarytnmgnwsngarccngaygggnathwsnytnnggngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccngngaygcngtnngcnytnnggnytnartgytacytnaytnaaraaygtacntgycartggcargcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytaycaywsnmngcncnmngntgytgyccnmngaymgnayccnathgggaaaytgyg
 argargargaraaracnaayccngnytnaracnccncarttywsnmngntgytcaaytnaarsnmgnaaygaywsnathath
 cayathytnngargtnacnacngcncnggnacngtnacaywsntaytnggnwsnccnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacnccnaaytncaytggmngarathwsnwsnggncaytngarytnartggcargayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytacytnmgnayacngngarggncaycargaytggargtnytnarccncnytnnggngcncmng
 gngnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgnaymgnytncarytnmngcncmgnytnaayggncncnactaycarg
 ncncntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntngaracngcncnagargacngcngtggathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytngtnytnngnytnwsngcngntnytnngnytnytnytnmngntggcartyccngcncaytymgnmgnytngmncaygc
 nytnngcncnwsnytnccngaytncaymngntnytnngncartaytnmngayacngcngcnytnwsnccncnaraargcn
 acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytnccnarsnwsngarmgnacncnytnccnytn
 ntgywsnwsncargcncaratggaytymgnmgnytncarccnwsntgyytnngnacntatgccnytnwsngntngtyccncn
 atggcngarwsnggnwsntgytgyacnacncayathgcnaycaywsntaytncnytnwsntaytggcargarccnmgnm
 gnmngngnaaracnaaycaytayaracnacngtnagaraarwsnytnacnathaygcncargtnaracnccnggncn
 ytnaraaraaytngaywsnttyccngcncargayccntgyacnacnathaygtngcngcncnagargcngtnccngarwsng
 tncargaracnaaywsnathacngntaygcncnwsngtnacnytnccngarwsnttrtr

SEC ID NO. 6: TpoR.IL2ry

721 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (negrita): dominio extracelular de TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (negrita, cursiva): dominio citoplasmático TpoR,

636-721 (sin formato): dominio citoplasmático IL2ry.

MPSWALFMVTSCLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFDVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPESDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRSEASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTDLPDGAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFFYHSRARCPCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPMAESGS
CCTTHIANHSYPLSYWQQPERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYS
ERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCYTLKPET**

SEC ID No. 20: TpoR.IL2ry

atgccnwsntgggcnynttntatggtacnwsntgytntnyntngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snyntytngcncwsngaywsngarccnytnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytytgggagargargargcn
 gncncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytygggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnttytccnytncaaytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmgngntytntytngaywsntgggnytnccngcncncncnwsnathathaaargcnat
 gggngnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncncngarathwsngaytytnmgtaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncncacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncwsngcnytnaycarwsnccntgygcncarccnacnatgccntggcargayggncncnara
 cncwsnccnwsnmngargcncwsngcnytnacngcngarggngnwsntgyttnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytggynacarytnmgnwsngarccngayggcnathwsntnggngnwsntgggncnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gaytntccngngaygcngntngcnytnngnytnartgytyacnytnaytnaaraaygtacntgycartggcarcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytytaycaywsnmngcncmgtgytyccnmngaymgtayccnathgggaaaytyg
 argargargaraaracnaayccngnytnaracncncarttywsnmgtgytaytyaarwsnmgnaaygaywsnathath
 cayathytngtnargtnacnacngcncngnagntncaywsntaytnggncnccnttytgathcaycargcngntmgn
 ytnccnacncnaaytncaytggmngarathwsnwsnggncaytngarytnartggcarcaycncnwsntgggncg
 cncargaracntgytaycarytnmgtayacngngarggncaycargaytgaargtnytnarccncnytnnggncnmng
 gnggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgtaymgnytncarytnmngcncmgnytnaayggncnacntaycargg
 nccntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntgaracngcncacngaracngcngtgathwsnytnacngcnytnca
 yytngntnynggnytnwsngcngntnytnngnytnytnytnmgtggcarttyccngcncaytaymngmnytnmgncaayc
 nytnngccnwsnytnccngaytncaymngntnytnngcncartaytnmngayacngcngcnytnwsnccncnaargcn
 acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytncnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytn
 ntgywsnwsncargcncaratggaytaymngmnytnarccnwsntgytnggnacnatgccnytnwsngntngyccncn
 atggcngarwsngnwsntgytyacnacncayathgcnaaycaywsntaytncnytnwsntaytggcarcarccngarmg
 nacnatgccnmgnathccnacnytnaaraaytngargaytngtnacngartaycayggnaaytywsngcngtgwsnggng
 tnwsnaarggnytnngcngarwsnytnarccngaytaywsngarmgnytnytnytnwsngarathccncnaarggngn
 gnytnnggngarggncnggncnwsnccntgyaaycarcaywsnccntaytgggncncncntgytayacnytnaarcnga
 racntrrrr

SEC ID No. 7: TpoR-TLR1

817 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (**negrita**): dominio extracelular TpoR, 492-513 (**negrita**, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (**negrita**, *cursiva*): dominio citoplasmático TpoR,

636-817 (sin formato): dominio citoplasmático TLR1.

**MPSWALFMVTSCLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ**

**RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPFISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFFYHSRARCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLEPLGARGGTLELRPRSRYLRLRLRNLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRLVGLGQYLRDTAALSPPK
**ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPMAESGS
 CCTTHIANHSYPLSYWQQPDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYSGH
 DSFWWKNEILLNLEKEGMQICLHERNFVPGKSIVENIITCIEKSYKSIFVLSNPNFVQSEWCHYEL
 YFAHNLHFHEGSNSLILILLEPIQYSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKRGLFWANLRAAI
 NIKLTEQAKK******

SEC ID No. 21: TpoR-TLR1

atgccnwsntgggcnynttntatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgytgytgggagargargcn
 gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngngaraarccnmngcngtyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytygggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnttytccnytncaaytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnytnyngaywsngtggnytnccngcncncnwsnathathargcnat
 gggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncncgarathwsngaytytnmgtaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncwsngcnytnaycarwsnccntgygcncarccnacnatgccntggcargayggncnaarcara
 cncwsnccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytgytncarytnmgnwsngarccngayggcnathwsnytnngnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccngngaygcngtnyngnytnartgyttnacnytnayytnaaraaygtnacntgycartggcarcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytaycaywsnmngcncmngntgytgyccnmngaymgtayccnathtgggaaaytyg
 argargargaraaracnaayccngnytnaracncncarttywsnmngntgytcaaytnaaywsnmgnayaywsnathath
 cayathytngtnargtnacnacngcncnggnacngtncaaywsntayytnnggnwsnccnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacncnaayytncaytggmngarathwsnwsnggncayytnarytnartggcarcayccnwsnwsntgggcn
 cncargaracntgytarytnmgtayacngngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnngngcncmng
 gnggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgtaymgnytncarytnmngcncmgnnytnaayggncnacntaycargg
 ncntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntgaracngcncacngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnytnyngnytnwsngcngtnytnngnytnytnytnmngntggcarttyccngcncaytymgnmgnymgnaygc
 nytnngccnwsnytnccngayytncaymngntnytnngcncartayytnmngayacngcngcnytnwsnccncnaargcn
 acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytncnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytn
 ntgywsnwsncargcncaratggaytymgnmgnytncarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsntntgyccncn
 atggcngarwsnggnwsntgytgyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcarcarccngayytn
 ccntggatayytnmgnatggntngycartggacncaracnmgnmngmngcncmgnayathccnytnargarytnarmgn
 aayytnarttycaygcnttyathwsntaywsnggncaygaywsnttytgggtnaaraaygarytnytnccnaayytnaraargar
 ggnatgarathgyytncaygarmgnaaytytgtnccnggnaarwsnathgtngaraayathathacntgyathgaraarwsnta
 yaarwsnathtygtnytnwsnccnaaytytgtnarwsngartggtycaytaygarytnaytygcncaycayaaaynttycay
 garggnwsnaaywsnytnathyttnytnytnarccnathccncartaywsnathccnwsnwsntaycayaaarytnaarwsn
 ytnatggcncmngmgnacntayytnartggccnaargaraarwsnaarmnggnytnnttytgggcnayytnmngcncngcnat
 haayathaarytnacngarcargcnaaraartrtr

SEC ID No. 8: TpoR-TIAF1

750 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (**negrita**): dominio extracelular de TpoR, 492-513 (**negrita**, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (**negrita**, *cursiva*): dominio citoplasmático TpoR,

636-750 (sin formato): dominio citoplasmático TIAF1.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSPTSREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFYHSRARCPCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYPLSYWQQPMSSPSPFREQSFLCAAGDAGEESRVQVLKNEVRRGSPVLLG
 WVEQAYADKCVCGPSAPPAPTPPSLSQRVMCNDLFKVNPFQLQQFRADPSTASLLLCPPGGLD
 HKLNLRGKAWG**

SEC ID No. 22: TpoR.TIAF1

atgccnwsntgggcnynttntatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncnwsngaywsngarccnytnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytgyggaygargargcnc
 gcncncnwsngnncntaycarytnytnaygcntayccnmgnagaraarccnmgnngcnytnwsnwsncarwsnatgc
 ncaytygggnacnmgnntaygntgyccarttyccngaycargargargtnmgnnttytyccnytncaaytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaaargnat
 gggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncncgarathwsngaytytnmgnntaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncncnagntnathcarytnathgcnaacgaracntgytyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncnwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacnatgccntggcargayggncncnaarcara
 cncnwsncnwsnmngngargcncnwsngcnytnacngcngargnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytgytyncarytnmgnwsngarccngayggntathwsnytnngnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccngngaygcngtnynggnytnartgytyacnytnaytnaaraaygtacntgytcargcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytaycaywsnmngcncmngntgytyccnmngaymgnntayccnathgggaraaytygy
 argargargaraaracnaayccnggnytnaracncncarttywsnmngntgyaytyaarwsnmngnaaygaywsnathath
 cayathyngntngargtnacnacngcncngnagntncaaywsntaytnggnwsncnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacncnaaytncaytggmnggarathwsnwsnggncaytyngarytnartggcarcayccnwsnwsntgggng
 ncargaracntgytaycarytnmgnntayacngngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnngngcncmng
 ngggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmngntaymgnntcarytnmngcncmngnytnaayggncncnacntaycargg
 nccntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntngaracngcncgaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnytnynggnytnwsngcngntnynggnytnytnytnmngntggcarttyccngcncaytaymngmnytnmngncaygc
 nytnngccnwsnytnccngayytncaymngntnynggncartaytnmnggayacngcngcnytnwsnccncncnaargcn
 acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytn
 ntgywsnwsncargcncaratggaytaymngmngnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngntngtyccncn
 atggcngarwsnggnwsntgytyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggarcarccnatgws
 nwsnccnwsnwsnccntymngarcarwsnttytnngycngcngngaygcngngargarwsnmngntncargtnytn
 aaraaygargtnmngmnggnwsnccngntnytnytnngntgggtnarccngcncaycngayaartgygtntgyggncnws
 ngcncncncngcncncnacncncncnwsnytnwsncarmngntnatgtgyaaygayytnntyaargtnaayccnttycarytnar
 cartymngngcngayccnwsnacngcncnwsnytnytnytnngtyccngnggnytnaycayaaaytnaaytnmngngnaarg
 cntgggntrtrr

SEC ID No.9: Tpor-CD40

697 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales

1-491 (negrita): dominio extracelular de TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (**negrita, cursiva**): dominio citoplasmático TpoR,
636-697 (**sin formato**): dominio citoplasmático CD40.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSG
TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
RVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQ
PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
HASSQGGFFYHSRARCPCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKSRNDSIIHILVEVTT
APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYLPISYWQQPKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHGC
QPVTQEDGKESRISVQERQ**

SEC ID No. 23: TpoR-CD40

atgccnwsntgggcnhtnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
snytnyngcncnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttygggagargargargcn
gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngtgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
cncaytygggnacnmgtaygntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnttytyccnytncaaytntgggtnaaraaygt
nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnytnyngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaaargcnat
ggnggnwsnccarccngngnarytnarathwsntgggargarccngcncncngarathwsngaytytnmgtaygarytnm
gntayggncnmngnagayccnaaraaywsnacnggncncnagntnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytn
carmgncncaywsngcncnwsngcnytnagaycarwsnccntgygcncarccnaccnatgcntggcargayggncncaarcara
cwnsncnwsnmngnargcncnwsngcnytnacngcngargnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
ntaytgytncarytnmgnwsngarccngaygggnathwsnytnnggngnwsntggggnwsntgggwsnytnccngtnacngtn
gayytnccngngaygcngtngcnytnnggnytnartgytacytnyngaytnaaraaygtnacntgycartggcargcargay
caygcncnwsnwsncarggnttytyaycaywsnmngcncnmgtgytgyccnmngaymgtayccnathgggaaaytygy
argargargaraaracnaayccngnytnaracncncarttywsnmgtgytgyttaaarsnmgnaaygaywsnathath
cayathyngtngargtnacnacngcncnggnacngtnacaywsntaytnggnwsnccnttytgathcaycargcngtnmgn
ytncncnccnaayytncaytggmngarathwsnwsnggncayytnarytnartggcargayccnwsnwsntgggng
cncargaracntgytacytnmgtayacngngargngncaycargaytggaargtnytnarccncnytnnggngcncmngn
gnggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgtaymgnytncarytnmngcncmgnytnaayggncnaccntaycargg
ncntggwsnwsntggwsngayccnaccnmngtnaracngcncnargaracngcngtggathwsnytnytnacngcnytnca
yytnytnynggnytnwsngcngtntnytnytnytnmgtggcartyccngcncaytaymgnmgnytmgnacaygc
nytnngcncnwsnytnccngayytncaymngntnytnngncartaytnmngayacngcngcnytnwsnccncncaargcn
acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytnarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytn
ntgywsnwsncargcncaratggaytaymgnmgnytncarccnwsntgyytnngnaccnatgcnnytnwsngntngyccncn
atggcngarwsnggnwsntgytgyacnacncayathgcnaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcargcncnaaraar
gtngcnaaraarccnaccnaayaargcncncayccnaarccnargaracncnargarathaaytyccngaygayytnccngnwsn
aayacngcngcncngtnaracnytncaayggntgyarccngtnacncargargayggnaargarwsnmgnathwsngt
ncargarmgncarttrrr

SEC ID No. 10: TpoR-ITAM1

676 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales
1-491 (**negrita**): dominio extracelular TpoR, 492-513 (**negrita, subrayado**):

dominio TpoR TM, 514-635 (negrita, cursiva): dominio citoplasmático TpoR,
636-676 (sin formato): dominio citoplasmático ITAM1.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFWDEEEAAPSG
TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ

LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPKQTSRSEASALTAEGGSCSLISGLQ
PGNSYWLQLRSEPDGISLGGWSWSLPTVTDLPDGAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
HASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTT
APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGE
HQDWKVLEPPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYLPLSYWQQPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR*

SEC ID NO. 24: TpoR.ITAM1

atgcnwsntgggcnyntttaggtgnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncargaygtw
snytnyngcncwsngaywsngarcnnytnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytytgggagygargargcn
gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmgngaraarccnmgngcntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
cncaytygggnacnmgntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnyntnttytccnytncayyntntgggtnaaraaygt
nttytnaaycaracnmgnacncarmgngtnytnytnyngaywsngntggnytnccngcncncnwsnathathaaargcnat
gggnggnwsncarcnggngarytnacarathwsntgggargarcncngcncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
gntayggngccnmgngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaraacntgytyccngcnytn
carmgncncncaysngcncwsngcnytnaycarwsnccntgygcncarccnacnatgcncntggcargayggncncaarca
cnwsnccnwsnmngngargcncwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
ntaytgytncarytnmgwnsngarcngcayggnathwsnytnnggnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
gayytnccnggngaycngntgcnynngnytnarctgyttnacnytnayytnaaraaygtacntgycartggcarcargay
caygcncwsnwsncarggnttytytaycaywsnmgngcncngntgytygycnmngngaymgntayccnathtgggaraaytyg
argargargaraaracnaayccnggnytnaracnccncarttywsnmgntgycaytyaarwsnmgnaaygaywsnathath
cayathytngtngargtnacnacngcncnggnacngtnacaywsntayytnngnwsnccnttytgathcaycargcngtnmg
ytnccnacnccnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggng
cncargaracntgytaycarytnmgntayacnggngarggncaycargaytggagartnytnarccnccnytnnggngcnmng
gnggnacnytngarytnmgncncnmgnwsnmgntaymgnytnrcarytnmgngcnmgnytnaayggncnacntaycargg
nccntggwsnwsntggwsngayccnacnmgngtngaracngcnacngaracngcntggathwsnytngtnacngcnytnca
yytngtntnyngnytnwsngcngntnytnngnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgnmgnytnmgncaygc
nytnntggccnwsnytnccngayytncaymgngtnytnngncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccnccnaargcn
acngtnwsngayacntgygargargtngarccnwsnytnytngarathytnccnaarwsnwsngarmgnacnccnytnccnytn
ntgywsnwsncargcncaracntggaytaymgnmgnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngntntgyccnccn
atggcngarwsnggnwsntgytyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcarcarccnmgnt
naartytnwsnmgnwsngcaygarmcncngcngtnacngcngaragncaraaycarytnayaaygarytnaayytnngnmgnmg
gargartaygaygtntngayaaarmgmngngnmgntrtrr

SEC ID No. 11: TpoR.TpoR-cyt.LMP1-cyt

836 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales
1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):

dominio TpoR TM, 514-635 (**negrita, cursiva**): dominio citoplasmático TpoR,
636-836 (sin formato): dominio citoplasmático LMP-1.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTEFLTCFWDEEEAAPSG
TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
RVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPESDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQ
PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
HASSQGFFYHSRARCPCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKSRNDSIIHILVEVTT**

**APGTVHSYLGSFPIHQAIVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLL****RWQFPAHYRRLRHAWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPK
ATVSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPMAESGS
CCTTHIANHSYLPYSYQQPYHGQRHSDEHHHDDSLPHPQQATDDSGHESDSNSNEGRHHL
LVSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQDPDNT
DDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEVENKGGDQGPPLMTDGGGGH
SHDSGHGGGDPHLPTLLLSSSGSGGDDDDPHGPVQLSYD****

SEC ID No. 25: TpoR.TpoR-cyt.LMP1-cyt

atgccnwsntgggcnynnttatyatggnacnwsntgytntytntngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncargaygtw
snyntytngcncnwsngaywsngarccnynnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytytgaggaygargargcnc
gncncnwsngnncntaycaryntytntaygcntayccnmngnaraarccnmngncntgyccnynwsnwsncarwsnatgc
cncaytygggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnttytccnynncaynttggttnaaraaygt
nttytnaaycaracnmgnacncarmngntntytntgngaywsngtnggntnccngcncncncnwsnathathargcna
ggngngnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarccngcncncngarathwsngaytytnmgtntaygarytnm
gntayggncnmngayccnaaraaywsnacngnccnncngtnathcarytnathgcncnargacntgytyccngcnytn
carmngncncaywsngcncnwsngcnytnaycarwsnccntgygcncarccnncatgcncntggcargayggncncnara
cncnwsncnwsnmngngargcncnwsngcnytnacngcngargngngnwsntgytnathwsnggntncarccngnnaayws
ntaytggytnarytnmgnwsngarccngayggcnathwsntngngngnwsntggngnwsntggwsntnccngtnacngtn
gayntnccngngaygcngtngcnytnnggntncartgytyacnytnaytnaaraaytnacntgycartggcargcargay
caygcnwsnwsncargnttytytaycaywsnmngcncmngntgytyccnmngaymgtntayccnathtggaaraaytyg
argargargaraaracnaayccngnytnaracncncarttywsnmngntgycaytyaarwsnmngnaaygaywsnathath
cayathytngtngargtnacnccngcncngnncngtnacaywsntaytnggnwsnccnttytgathcaycargcngtnmgn
ytncncnccnaaytnaytgmgngarathwsnwsnggncaytngarytnartggcargayccnwsnwsntgggng
cncargaracntgytaycarytnmgtntayacngngarggncaycargaytggaartnytnarccncnytnngngcncmng
gnggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgtntaymgnytncarytnmngcncmgnytnaayggncncnactaycargg
nccntggwsnwsntggwsngayccnccnmngntngaracngcncnargaracngcngtgathwsnytnngtnacngcnytnca
yytntgntnggnytnwsngcngntntnggntntntntntmngntggcarttyccngcncaytaymgnmgnytntmngncaygc
nyntnggcnwsnytnccngayytncaymngntntnggncartaytnmngayacngcngcnytnwsnccncncnargcn
acngtnwsngayacntgygargargtnarccnwsnytnytngarathytncnnaarwsnwsngarmgnacncnytnccny
ntgywsnwsncargcncaratggaytaymgnmgnytncarccnwsntgytnggnacnatgccnytnwsngntngyccncn
atggcngarwsngnwsntgytyacnncayathgcnayaywsntaytncnytnwsntaytggarccncntaycay
ggncarmngncaywsngaygaraycaycaygaywsnytnccncayccncarccngaygaywsnggncayga
rwsngaywsnaaywsnaaygargnmngncaycaytyntngtnwsnggngcngngayggncncnytnngywsncara
aytnggngcncngngngngngngngayayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncargayccn
gayaayacngaygayaayggncncaygayccnytnccncargayccngayaayacngaygayaayggncncargaycc
ngayaayacngaygayaayggncncaygayccnytnccncaywsnccnwsngaywsngcngngnnaaygayggnggnc
nccncarytnacngargargtnaraayaargngngngaycarggncncnytnatgacngayggngngngngncaywsn
caygaywsnggncayggngngngngayccncaytnccnnytnytntngnwsnwsnggngngngngngaygay
aygayccncayggncngntncarytnwsntaytaygaytrrr

SEC ID No. 12: TpoR.LMP1-cyt

714 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales
 1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado):
 dominio TpoR TM, 514-714 (sin formato): dominio citoplasmático LMP-1.

**MPSWALFMVTSCLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTEFLTCFWDEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLVWKNVFLNQTRTQ**

**RVLFDVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPFISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFYHSRARCPCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLYHGQRHSDEHHHDDSLPHPQQATDDSGHESDSNSNEGRHH
 LLVSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQDPDN
 TDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEEVENKGGDQGPPLMTDGGGG
 HSHDSGHGGGDPHLPTLLLGSSSGSGDDDDPHGVPVQLSYD****

SEC ID No. 26: TpoR.LMP1-cyt

atgccnwsntgggcnynttntatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncnwsngaywsngarccnytnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytytgggaygargargcnc
 gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmgnagaraarccnmngncntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc
 cncaytyggncnmgntaygntgycarttyccngaycargargtnmgnytnnttytyccnytncaaytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttytgngaywsngtnggnytnccngcncncncnwsnathathargnat
 gggnggnwsncarcngnggarytnarathwsntgggargarcngcncncngarathwsngaytytnmgntaygarytnm
 gntayggncncmngayccnaaraaywsnacngngcncacntnathcarytnathgcncacngaracntgytyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncnwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacntatgcntggcargayggncncnarcara
 cncnwsncnwsnmngngargcncnwsngcnytnacngcngargngggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytgytyncarytnmgncnwsngarccngayggngathwsnytnnggngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccnggngaygcngtnynggnytnartgytyacnytnayytnaaraaygtacntgycartggcarcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytyaycaywsnmngncnmngntgytyccnmngnaysmgntayccnathtggaraytygy
 argargargaraaracnaayccngnytnaracncncarttywsnmngntgyaytyaarwsnmngnaaygaywsnathath
 cayathyngtnargtnacnacngcncngnacngtnaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacncnaayytnaytgmgngarathwsnwsnggncayytnarytnartggcarcayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytaycarytnmgntayacngngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnngngcncmng
 gnggnacnytnarytnmgncncmgnwsnmngntaymngnytnarytnmgncncmngnytnaayggncnacntaycargg
 ncntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntngaracngcncacngaracngcngtgathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnytnynggnytnwsngcngtnytnytnytnytnaycayggncarmgncaywsngaygaraycaycaygayga
 ywsnytnccncayccncarcargcncacngaygaywsnggncaygarwsngaywsnaaywsnaaygarggngmncaycay
 ytnyngtnwsnggngcnggn
 gayggncncnytnytnywsncaraayytnngngcncngngngngngngncngayaayggncncargayccngayaayacn
 gaygayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncaygayccnytnccncargayccngayaayac
 ngaygayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncaygayccnytnccncaywsnccnwsngay
 wsngcnggnaaygayggngncncncarytnacngargargtngaraayaargngngngaycarggncncncnytnatga
 cngayggngngngngncaywsncaygaywsnggncayggngngngngayccncayytnccnacnytnytnynggngws
 nwsnggnwsnggngngngaygaygaygayccncayggncngtnarytnwsntaytaygytrrrr

SEC ID No. 13: TpoRec.TpoRtm.CD137cyto

555 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales 1-491 (**negrita**): dominio extracelular TpoR, 492-513 (**negrita, subrayado**): dominio TpoR TM, 514-555 (sin formato): dominio citoplasmático CD137.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRFTFEDLTCFWDEEEAAPSG
TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
RLVTFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAEISDFLRYELRYGPRDPKNSTGPTVIQ
LIATETCCPALGRPHASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKTSPSREASALTAEAGSCSLISGLQ
PGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPLVTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD

HASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDIIHILVEVTT
APGTVHSYLGSFPIHQAIVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
HQDWKVLPEPLGARGGTLELRPSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCE
**

SEC ID No. 27: TpoRec.TpoRtm.CD137cyto

atgacnwsntgggcnyntttaggtgnacnwsntgyytnytnyngcncncaraayyngcncargtnwsnwsncargaygtw
snytnyngcncwsngaywsngarccnytnaartgytywsnmgnacnttygargayytnacntgyttygggagygargargcn
gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngtyccnytnwsnwsncarwsnatgc
cncaytyggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnynynttytyccnytncayyntngggtnaaraaygt
nttytnaaycaracnmgnancarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaaargcnat
ggngggnwsncarccngngarytnacarathwsntgggargarcngcncngarathwsngaytyytnmgtaygarytnm
gntayggncnmnggayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytyccngcnytn
carmgncncaywsngcncwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacnatgccttgccargayggncnaarcar
cnwsncnwsnmngargcncwsngcnytnacngcarggngggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
ntaytggynrcarytnmgnwsngarccngayggnathwsnytnnggngnwsntggggnwsntggwsnytnccngcncn
gaytnccnggngaygcngtngcnytnggnytncartgytyacnytngayytnaaraaygtacntgycartggcarcarcargay
caygcncwsnwsncarggnttytytaycaywsnmgngcnmgtgytyccnmnggaymgtayccnathtgggaraaytyg
argargargaraaracnaayccnggnytnacaracncncarttywsnmgtgycaytyaarwsnmgnaaygaywsnathath
cayathytngtngargtnacnacngcncnggnacngtnacaywsntayytnnggwsnccnttytgathcaycargcngtnmgn
ytncncacncnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggcng
cncargaracntgytaycarytnmgtayacnggngarggncaycargaytggaargtnytngarccncnytnnggngcnmng
gnggnacnytngarytnmgncnmgnwsnmgtaymgnytncarytnmngcngnmgnytnaayggncnacntaycargg
nccntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcngtgathwsnytngtnacngcnytnca
yytngtnytnngnytnwsngcngtnytnnggnytnytnytnytnaarmgngnmgnaaraarytnytnayathtyaarccntt
yatgmngcngtnacaracnacargargargayggntgywsntgymgnttyccngargargargarggnggntgygarytntrt
rr

SEC ID No. 14: TpoRec.TpoRtm.CD28cyto

554 aminoácidos presentados en la dirección del extremo N a C, de los cuales 1-491 (negrita): dominio extracelular TpoR, 492-513 (negrita, subrayado): dominio TpoR TM, 514-554 (sin formato): dominio citoplasmático CD28.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFWDEEEEAAPSG
 TYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRTQ
 RVLFDVSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFLRYELRYGPRDPKINSTGPTVIQ
 LIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDGPQKQTSRSPREASALTAEGGSCLISGLQ
 PGNSYWLQLRSEPDGSLGGSWGSWSLPTVDLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQD
 HASSQGFYHSRARCPCPRDRYPIWENCEEEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTT
 APGTVHSYLGSPFWIHQAVRLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSSWAAQETCYQLRYTGEG
 HQDWKVLPLEPLGARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAW
ISLVTALHLVLGLSAVLGLLLLRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
 **

SEC ID No. 28: TpoRec.TpoRtm.CD28cyto

atgccnwsntgggcnyntnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncargaygtnw
 snytnyngcncwsngaywsngarccnytnaartgytywsnmgnacnttygargaytnacntgytytgggagargargcnc
 gcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngngaraarccnmngcngntgyccnytnwsnwsncarwsnatgc

cncaytygggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnttyccnytncayytntgggtnaaraaygt
 nttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaargcnat
 gggnggnwsncarccngnggarytnarathwsntgggargarccngcncngarathwsngaytytnmgtaygarytnm
 gntayggncnmngngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytyccngcnytn
 carmgncncaywsngcncwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacnatgcctggcargayggncnaarara
 cnwsncnwsnmngngargcncwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaayws
 ntaytggynarytnmgnwsngarccngaygggnathwsnytnngngnwsntgggngnwsntggwsnytnccngtnacngtn
 gayytnccngngaygcngtngcnytnngnytnartgytyacnytnayytnaaraaytnacntgycartggcarcargay
 caygcncnwsnwsncarggnttytyaycaywsnmngncnmgtgytyccnmngaymgntayccnathgggaaaytyg
 argargargaraaracnaayccngnytnaracncncarttywsnmgtgyaytyaarwsnmgnaaygaywsnathath
 cayathytngtngargtnacnacngcncngnacngtnaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacncnaayytncaytggmnggarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarayccnwsnwsntgggng
 cncargaracntgytaycarytnmgtayacngngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnngngcnmng
 gnggnacnytnarytnmgnccnmgnwsnmgtaymgnytnarytnmngcncmgnytayggncnacntaycargg
 nccntggwsnwsntggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcnggathwsnytnngtnacngcnytnca
 yytnytnyngnytnwsngcngntnytnngnytnytnytnmgnwsnaarmgnwsnmgnytntaywsngaytayatga
 ayatgacncnmngmngcnggncnacnmgnaracaytarcctaygcncncncnmngaytygcngcnytnaymgn
 wsntrtrr