

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190100 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.23(51) Int. Cl. C07K 14/72 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)(22) Дата подачи заявки
2019.06.21

(54) ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ФАКТОРОВ РОСТА

(31) 1810181.6

(72) Изобретатель:

(32) 2018.06.21

Прайс Никола Кайе, Бриджмен Джон
Стивен (GB)

(33) GB

(86) PCT/GB2019/051745

(74) Представитель:

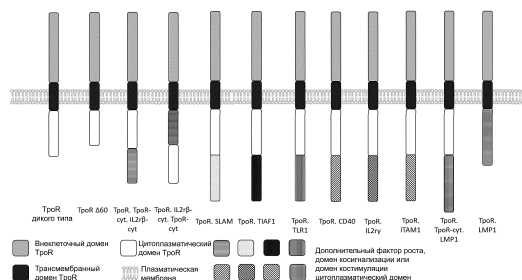
(87) WO 2019/243835 2019.12.26

Фелицына С.Б. (RU)

(71) Заявитель:

ИНСТИЛ БАЙО (ЮКей) ЛИМИТЕД
(GB)

(57) Адоптивная клеточная терапия включает перенос аутологичных или аллогенных клеток пациентам с целью лечения различных заболеваний. В области иммунотерапии опухолеспецифические Т-клетки можно выращивать *ex vivo* или прививать опухолевую специфичность с помощью подходов генной инженерии до реинфузии. Инфузии Т-клеток требуют предварительной обработки, а часто и послеинфузионной обработки с помощью ИЛ-2, чтобы улучшить живучесть и приживление. В данном документе авторы показывают, что Т-клетки могут быть сконструированы для экспрессии химерного рекомбинантного рецептора фактора роста (CrGFR), который обеспечивает избирательное выживание и/или размножение Т-клеток при введении клинически доступного лекарственного средства - Элтромбопага.



A1

202190100

202190100

A1

ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ФАКТОРОВ РОСТА

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Адоптивная клеточная терапия (АКТ) с применением аутологичных Т-клеток для регресса злокачественной опухоли показала многообещающие результаты в ранних клинических испытаниях. Было принято несколько общих подходов, таких как применение естественных опухоль-реактивных или инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), размноженных *ex vivo*. Кроме того, Т-клетки можно модифицировать генетически, чтобы перенацелить их на определенные опухолевые антигены. Это может быть сделано посредством переноса Т-клеточных рецепторов (TCR), специфичных к пептидному (р) -основному комплексу гистосовместимости (МНС), или синтетического гибрида опухолеспецифичного одноцепочечного фрагмента антитела (scFv) и сигнальных доменов Т-клеток (например, CD3 ζ), последние называются химерными антигенными рецепторами (CAR). Перенос TIL и TCR оказался особенно эффективным при нацеливании на меланому (Rosenberg et al. 2011; Morgan 2006), тогда как CAR-терапия показала многообещающие результаты при лечении некоторых злокачественных новообразований В-клеток (Grupp et al. 2013).

Текущий общий протокол лечения с помощью АКТ требует начального немиелоаблативного прекондиционирующего лечения с применением циклофосфида и/или флударабина, которое удаляет большую часть циркулирующих лимфоцитов у пациентов до реинфузии клеток, выращенных *ex vivo*. Это позволяет новым клеткам размножаться и устраняет потенциальные «потребители цитокинов», с помощью которых нормальные клетки конкурируют с вновь введенными клетками за сигналы роста и выживания. Наряду с клетками пациенты получают поддержку цитокинами посредством инфузий высоких доз интерлейкина (IL)-2, который помогает новым клеткам приживаться и размножаться.

Существует ряд факторов, которые в настоящее время ограничивают технологию Т-клеточной АКТ. Текущая прекондиционная терапия, описанная выше, требует госпитализации и потенциально оставляет пациентов в состоянии с ослабленным иммунитетом. Более того, многие пациенты находятся в недостаточно здоровом состоянии, чтобы выдерживать суровые условия этого режима лечения. Вне прекондиционирования, применение IL-2 в качестве поддерживающей терапии связано с тяжелой токсичностью и потенциальной интенсивной терапией. Действительно, сама терапия TIL, в отличие от терапии TCR и CAR, не была связана с какой-либо тяжелой

токсичностью как на мишени, так и вне ее, при этом большинство случаев токсичности было связано с сопровождающими инфузиями ПЛ-2.

Способы, с помощью которых можно свести к минимуму или сократить прекондиционирование и поддерживающее лечение ПЛ-2, будут иметь серьезные преимущества, поскольку они: (i) уменьшат количество госпитализаций, (ii) увеличат долю потенциальных пациентов, которых можно лечить с помощью АСТ, (iii) снизят клинические затраты, связанные с длительной госпитализацией, тем самым снова открывая возможность АСТ для большего числа пациентов.

Таким образом, существует потребность в новых методах лечения АСТ, которые сводят к минимуму необходимость в предварительных обработках и/или поддерживающих курсах лечения ПЛ-2.

В настоящем изобретении используются клетки, которые экспрессируют рекомбинантные химерные рецепторы факторов роста, которые можно включать или выключать путем введения лиганда для c-Kit , который может быть клинически подтвержденным лекарственным средством. Это позволяет размножить клетки-мишени *in vivo* с минимальной токсичностью для других клеток.

В ряде отчетов идея инженерии рецепторов фактора роста использовалась как средство размножения определенных популяций клеток или для разработки способов отбора для стратегий конструирования антител. Например, в ряде отчетов было продемонстрировано, что гибриды антитело- TroR или EpoR могут использоваться для ряда биотехнологических стратегий, таких как отбор одноцепочечных антител (Ueda et al. 2000, Kawahara et al. 2004), и ряд сообщений продемонстрировал, что гибриды рецепторов факторов роста могут успешно увеличивать рост клеточной линии мегакарицитов Ba/F3 и/или гемопоэтических стволовых клеток (Jin et al. 2000; Richard et al. 2000; Nagashima et al. 2003; Kawahara et al. 2011; Saka et al. 2013).

Рецептор тромбопоэтина (Tro) (TroR ; CD110 , c-mpl) обычно экспрессируется в клетках линии мегакарицитов. В нормальном состоянии TroR включается в ответ на тромбопоэтин, который вызывает продуцирование тромбоцитов мегакарицитами. Существует также активная петля отрицательной обратной связи, с помощью которой экспрессия TroR тромбоцитами может использоваться как потребитель для снижения циркулирующих уровней Tro . Важно отметить, что TroR не экспрессируется ни в каких других нормальных тканях или злокачественных опухолевых клетках (Columbuova 1995).

Недавно в сообщении было продемонстрировано, что Т-клетки могут быть сконструированы с TroR дикого типа, которые могут обеспечить контролируемое выживание и рост Т-клеток посредством введения Tro или Элтромбопага (Nishimura et al.

2018). Однако не было сообщений о том, что Т-клетки или другие лимфоциты были сконструированы для экспрессии химерных рецепторов факторов роста, таких как гибридные рецепторы тромбозептина, и не было сообщений о применении этих клеток при АСТ.

ЧЕРТЕЖИ

Фигура 1 - Схематическое изображение химерных рекомбинантных рецепторов фактора роста, содержащих домены фактора роста. Эти рецепторы состоят из внеклеточного домена ТроR и трансмембранного домена, который пересекает плазматическую мембрану. Внутриклеточный домен состоит из цитоплазматического домена ТроR, слитого с одним или несколькими дополнительными доменами, которые увеличивают общую активность рецептора и могут быть получены в результате выбора домена фактора роста, домена косигнализации или костимулирующего домена, как подробно описано в легенде к фигуре. Δ60 = ТроR с С-концевой делецией из 60 аминокислот, IL2γ_{cyt} = цитоплазматический домен бета-цепи рецептора IL2, SLAM = SLAM/CD150, TIAF1 = TGFβ1-индуцированный антиапоптотический фактор 1, TLR1 = Toll-подобный рецептор 1, CD40 = CD40/TNFRSF5, IL2γ = общая гамма-цепь рецептора IL-2, ITAM1 = иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив из CD3ζ, LMP1 = латентный мембранный белок 1 вируса Эпштейна-Барра.

Фигура 2 - Схематическое изображение химерных рекомбинантных рецепторов фактора роста, содержащих костимулирующие домены. Эти рецепторы состоят из внеклеточного домена ТроR и трансмембранного домена, который пересекает плазматическую мембрану. Внутриклеточный домен состоит из костимулирующего домена, полученного от определенного костимулирующего рецептора, такого как, без ограничения указанным, CD28 или CD137.

Фигура 3 - Схематическое изображение генной организации трансгена лентивируса. Трансген ТроR был оптимизирован по кодонам и клонирован ниже промотора EF1α посредством пары рестрикционного расщепления XbaI и NheI в лентивирусном векторе pSF.Lenti.

Фигура 4 - Проточный анализ нетрансдуцированных химерных рекомбинантных рецепторов фактора роста дикого типа (WT) и вариантов в клетках Jurkat E6.1. Экспрессию оценивали через 72 часа после инфицирования с применением анти-CD110-PE антител.

Фигура 5 - Анализ активности химерного рекомбинантного рецептора фактора роста в клетках Ba/F3. Цитокин-зависимую линию В-клеток мыши Ba/F3 трансдуцировали указанными CrGFR и инкубировали либо с IL-3, либо с Элтромбопагом в течение 10 дней.

Экспрессию CrGFR оценивали с помощью проточной цитометрии в указанные моменты времени с применением анти-CD110 антител.

Фигура 6 - Анализ Элтромбопага и IL-2 на первичных человеческих Т-клетках из донора 1. Первичные человеческие Т-клетки из донора 1 трансдуцировали WT TroR или вариантом CrGFR и инкубировали в присутствии IL2 или Элтромбопага. Клетки удаляли во временные моменты вплоть до 21 дня и оценивали долю клеток, экспрессирующих рецептор, с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител и анализатора MACSQuant.

Фигура 7 - Анализ Элтромбопага и IL-2 на первичных человеческих Т-клетках из донора 2. Первичные человеческие Т-клетки из донора 2 трансдуцировали WT TroR или вариантом CrGFR и инкубировали в присутствии IL2 или Элтромбопага. Клетки удаляли во временные моменты вплоть до 21 дня и оценивали долю клеток, экспрессирующих рецептор, с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител и анализатора MACSQuant.

Фигура 8 - Анализ Элтромбопага и IL-2 на первичных человеческих Т-клетках из донора 3. Первичные человеческие Т-клетки из донора 3 трансдуцировали WT TroR или вариантом CrGFR и инкубировали в присутствии IL2 или Элтромбопага. Клетки удаляли во временные моменты вплоть до 21 дня и оценивали долю клеток, экспрессирующих рецептор, с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител и анализатора MACSQuant.

Фигура 9 - Отбор оптимальных CrGFR для следующего раунда анализа. Графики проточной цитометрии, показывающие экспрессию CrGFR в х3 донорских первичных Т-клетках человека после 21 дня инкубации в Элтромбопаге. Рецепторы TroR.CD40, TroR.IL2 γ , TroR.ITAM1, TroR.Δ60, TroR.LMP1-cyto и TroR.TroR-cyto.LMP1-cyto были выбраны для будущего сравнения с TroR дикого типа.

Фигура 10 - Анализ Элтромбопага и IL-2 на первичных человеческих Т-клетках из донора 4. Первичные человеческие Т-клетки из донора 4 трансдуцировали WT TroR или вариантным CrGFR и обогащали для экспрессии с помощью выбранной технологии Miltenyi MACS, и инкубировали их в присутствии IL2 или Элтромбопага. Клетки удаляли в моменты времени вплоть до 7 дней и количество клеток, экспрессирующих рецептор, оценивали с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител, красителя жизнеспособности DRAQ7 и анализатора MACSQuant.

Фигура 11 - Анализ Элтромбопага и IL-2 на отсортированных по CrGFR первичных человеческих Т-клетках из донора 5. Первичные человеческие Т-клетки из донора 5 трансдуцировали WT TroR или вариантным CrGFR и обогащали для экспрессии с

помощью выбранной технологии Miltenyi MACS, и инкубировали их в присутствии IL2 или Элтромбопага. Клетки удаляли в моменты времени вплоть до 7 дней и количество клеток, экспрессирующих рецептор, оценивали с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител, красителя жизнеспособности DRAQ7 и анализатора MACSQuant.

Фигура 12 - Анализ Элтромбопага и IL-2 на отсортированных по CrGFR первичных человеческих Т-клетках из донора б. Первичные человеческие Т-клетки из донора б трансдуцировали WT ТроR или вариантным CrGFR и обогащали для экспрессии с помощью выбранной технологии Miltenyi MACS, и инкубировали их в присутствии IL2 или Элтромбопага. Клетки удаляли в моменты времени вплоть до 7 дней и количество клеток, экспрессирующих рецептор, оценивали с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител, красителя жизнеспособности DRAQ7 и анализатора MACSQuant.

Фигура 13 - Анализ химерных рекомбинантных рецепторов фактора роста в TIL042. Проникающие в опухоль лимфоциты из TIL042 трансдуцировали с помощью WT ТроR или указанного вариантного CrGFR и инкубировали в присутствии совпадающих с пациентом опухолевых линий с добавлением IL2, Элтромбопага, IL-2 + Элтромбопага или без факторов роста. Клетки анализировали и подсчитывали на 4 и 7 дни, а количество клеток, экспрессирующих рецептор, оценивали с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител, красителя жизнеспособности DRAQ7 и анализатора MACSQuant. На графиках показано количество между 4 и 7 днями, когда происходит восстановление TIL после начального сокращения числа, вызванного факторами регуляции опухоли и/или гибели клеток, вызванной активацией.

Фигура 14 - Анализ химерных рекомбинантных рецепторов фактора роста в TIL яичников. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, из х3 TIL яичника трансдуцировали с помощью ТроR дикого типа или указанного вариантного CrGFR и инкубировали в присутствии подходящих опухолевых клеток пациента либо с Элтромбопагом, либо без факторов роста. Клетки анализировали и подсчитывали на 4 и 7 дни, а количество клеток, экспрессирующих рецептор, оценивали с применением конъюгированных с PE анти-CD110 антител, красителя жизнеспособности DRAQ7 и анализатора MACSQuant. На графиках показано количество между 4 и 7 днями, когда происходит восстановление TIL после начального сокращения числа, вызванного факторами регуляции опухоли и/или гибели клеток, вызванной активацией.

Фигура 15 - Индукция pSTAT химерными рекомбинантными рецепторами фактора роста. Выделяли первичные Т-клетки человека и трансдуцировали указанным CrGFR. Клетки обогащали экспрессией CrGFR с применением технологии Miltenyi MACS и размножали с помощью поликлональной стимуляции. Обогащенные клетки

стимулировали в течение 4 ч либо одной средой (RPMI), либо IL2, IL12, Тро или Эльтромбопагом (Elt) перед фиксацией метанолом и внутриклеточным окрашиванием антителами к фосфо-STAT5.

СУЩНОСТЬ АСПЕКТОВ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения показали, что можно конструировать лимфоциты, включая Т-клетки и НК-клетки, которые содержат CrGFR, который может функционировать как переключатель роста. Это позволяет увеличивать количество лимфоцитов *in vivo* путем введения пациенту лиганда CrGFR. Авторы изобретения показали, что CrGFR, например, на основе рецептора тромбopoэтина (Тро) (ТроR; CD110, c-mpl), индуцирует пролиферацию сконструированных лимфоцитов после связывания лиганда CrGFR с рецептором. Таким образом, лиганд вызывает пролиферацию клеток или защиту от вызванной активацией гибели клеток, которые экспрессируют CrGFR, но, как ожидается, будет иметь низкую токсичность из-за отсутствия или низкой экспрессии рецепторов на других клетках пациента. CrGFR, основанные на ТроR или других родственных рецепторах факторов роста, могут быть ценным инструментом для усиления роста лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* для адоптивной клеточной терапии.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает лимфоцит, включая Т-клетку или НК-клетку, содержащий химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR), включающий:

- (i) внеклеточный (EC) домен;
- (ii) трансмембранный (TM) домен тромбopoэтина; и
- (iii) первый внутриклеточный (IC) домен; и, необязательно, (iv) второй внутриклеточный домен.

CrGFR сконструирован таким образом, что связывание лиганда рецептора с CrGFR приводит к активации рецептора и передаче сигналов роста клетке, для индукции пролиферации и/или выживания.

Лиганд может быть человеческим тромбopoэтином или агонистом рецептора тромбopoэтина, например, Эльтромбопагом, Лузотромбопагом, Аватромбопагом или Ромпластимом.

Домен EC может быть доменом EC из c-mpl человека (который связывается с Тро человека) или может быть одним или несколькими из следующих элементов: i) укороченным доменом EC, ii) укороченным доменом EC из c-mpl, iii) селективным маркером, например, CD34.

Домен IC из CrGFR может включать домен связывания JAK. Домен IC состоит из двух или более рецепторов фактора роста или других сигнальных доменов, один из

которых может быть из списка: рецептор гормона роста человека, рецептор пролактина человека или рецептор тромбopoэтина человека (с-mpl) и дополнительный фактор роста или другие сигнальные домены, которые могут быть получены из списка (без ограничения указанным): сигнальных доменов рецептора цитокинов (например, рецептора IL2), доменов косигнализации (например, CD40), вирусных онкогенных белков (например, LMP1), костимулирующих доменов (например, CD28, CD137, CD150 и т. д.) или других митогенных доменов (например, Toll-подобных рецепторов, иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов, сигнальных доменов CD3 и т.д.).

Лимфоцит может быть Т-клеткой, включая лимфоцит, инфильтрирующий опухоль (TIL), регуляторную Т-клетку (Treg) или первичную Т-клетку, или НК-клетку, или дендритную клетку.

В дополнение к CrGFR лимфоцит, Т- или НК-клетка может включать рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) или химерный антигенный рецептор (CAR).

Во втором аспекте изобретение обеспечивает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CrGFR.

В третьем аспекте изобретение относится к вектору, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно второму аспекту и, если присутствует, последовательность нуклеиновой кислоты TCR и/или CAR.

В четвертом аспекте изобретение относится к способу получения лимфоцита, или Т- или НК-клетки, согласно первому аспекту изобретения, который включает стадию введения нуклеиновой кислоты, кодирующей CrGFR или вектор, в лимфоцит.

В пятом аспекте изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, которая содержит вектор в соответствии с третьим аспектом или лимфоцит (включая Т- или НК-клетки) в соответствии с первым аспектом вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом.

В шестом аспекте изобретение обеспечивает способ размножения клеток *in vivo*, включающий введение объекту лимфоцитов или Т- или НК-клеток первого аспекта или фармацевтической композиции пятого аспекта. Клетки можно размножать *in vivo* путем введения объекту тромбopoэтина или агониста тромбopoэтина, такого как Элтромбопаг.

В седьмом аспекте изобретение относится к лимфоциту, включая Т- или НК-клетку, в соответствии с первым аспектом или вектором в соответствии с третьим аспектом, для применения в адоптивной клеточной терапии.

В восьмом аспекте изобретение обеспечивает лимфоцит, включая Т- или НК-клетку, в соответствии с первым аспектом, или вектор в соответствии с третьим аспектом,

для применения в способе лечения онкологических заболеваний.

В девятом аспекте изобретение обеспечивает применение лимфоцита в соответствии с первым аспектом или применение вектора в соответствии с третьим аспектом при производстве лекарственного средства для лечения онкологических заболеваний.

В десятом аспекте изобретение относится к Элтромбопагу или Тро для применения в адоптивной клеточной терапии.

В одиннадцатом аспекте изобретение относится к Элтромбопагу или Тро для применения в увеличении *in vivo* лимфоцитов, включая Т- или NK-клетки.

В двенадцатом аспекте изобретение обеспечивает лимфоцит первого аспекта для применения в комбинации с тромбозептином или агонистом рецептора тромбозептина, например, Элтромбопагом, при лечении рака.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR)

В настоящем документе предложены рекомбинантные рецепторы фактора роста (CrGFR), включающие: (i) внеклеточный (EC) домен; (ii) трансмембранный (TM) домен тромбозептина; и (iii) внутриклеточный (IC) домен химерного рецептора фактора роста. В простой форме CrGFR может включать полноразмерный человеческий рецептор Тро (как показано на Фигуре 1 в данном документе) или его производное или вариант, который поддерживает передачу сигналов и пролиферацию клеток в ответ на связывание лиганда (например, может включать укороченный сигнальный домен тромбозептина, который, как было показано, поддерживает сигнальную способность). CrGFR может иметь модульную форму с доменами EC, TM и IC, происходящими из разных рецепторов. Однако CrGFR должен сохранять свою способность передавать сигнал роста клетке после связывания лиганда. CrGFR может активироваться и передавать сигнал роста клетке после связывания лиганда с доменом TM. Домен сигнализации может включать один или несколько дополнительных доменов сигнализации.

Подходящие CrGFR могут быть выбраны на основе GFR с ограниченной экспрессией в нормальной ткани человека, например, GFR, которые экспрессируются только в небольшой популяции клеток или ограничены определенным типом клеток, например, *c-kit*. Альтернативно, нативный лиганд-связывающий домен рецептора фактора роста может быть удален и, например, заменен маркером или другим доменом EC.

CrGFR может содержать домен EC без функции связывания фактора роста (например, усеченную форму домена ТроR EC) и/или маркер, например CD34), а также домены TM и IC из ТроR. Затем рост клеток, несущих этот тип рецептора, может быть

стимулирован связыванием элтромбопага с доменом ТМ.

CrGFR может экспрессироваться отдельно под контролем промотора в терапевтической популяции клеток, обладающих терапевтической активностью, например лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL).

Альтернативно, CrGFR может экспрессироваться вместе с терапевтическим трансгеном, таким как химерный антигенный рецептор (CAR) и/или Т-клеточный рецептор (TCR), например, как описано на Фигуре 14. Подходящие TCR и CAR хорошо известны в литературе, например, TCR, специфичные для HLA-A*02-NYESO-1 (Rapoport et al. Nat Med 2015) или анти-CD19scFv.CD3 ζ гибридные CAR (Kochenderfer et al. J Clin Oncol 2015), которые успешно использовались для лечения миеломы или В-клеточных злокачественных новообразований, соответственно. Описанные в данном документе CrGFR могут экспрессироваться с любым известным CAR или TCR, обеспечивая, таким образом, клетку регулируемым переключателем роста, позволяющим клеточное размножение/выживание in-vitro или in-vivo, а также обычным механизмом активации в форме TCR или CAR для противоопухолевой активности. Таким образом, изобретение обеспечивает клетку для применения в адоптивной клеточной терапии, содержащую CrGFR, как описано в данном документе, и TCR и/или CAR, которые специфически связываются с антигеном, ассоциированным с опухолью.

CrGFR может иметь домен ТМ и первый домен IC человеческого рецептора Тро и домен ЕС рецептора Тро дикого типа или укороченный домен ЕС рецептора Тро (без нативной функции связывания лиганда).

Конкретные воплощения CrGFR включают те, которые показаны на фигурах 1 и 2.

В некоторых воплощениях рецептор фактора роста (CrGFR) сконструирован так, что CrGFR основан на рецепторе ТроR, по меньшей мере, с областью ТМ и областью IC (см. SEQ ID No. 1, в которой показаны домен ТМ из ТроR и 514-635 и цитоплазматический домен ТроR) и с дополнительным (вторым) доменом IC, добавляемым к конструкции для усиления передачи сигналов в ответ на связывание Тро или агонистов Тро. Таким образом, в некоторых воплощениях CrGFR включает: (i) внеклеточный (ЕС) домен ТроR или укороченный ЕС-домен ТроR; (ii) трансмембранный (ТМ) домен тромбopoэтина; и (iii) первый внутриклеточный (IC) домен, содержащий домен IC тромбopoэтина человека (или его укороченную версию, например, дельта 60); и (iv) второй внутриклеточный домен, где второй внутриклеточный домен выбран из домена IC из костимулирующего рецептора, рецептора цитокина, рецептора косигнализации или рецептора тромбopoэтина человека (c-mpl). Например, второй домен IC может быть доменом IC из CD40, IL2R (IL2r β , IL2r γ), ITAM1 или LMP1.

В некоторых воплощениях crGFR содержит i) домен EC; и домены TM и IC, показанные в SEQ ID No 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14, или их варианты, идентичные по последовательности, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%. Подходящие домены EC включают описанные в данном документе, например, укороченный домен EC из ТроR. Эти рецепторы сохраняют свою способность связывать человеческий тромбозетин или агонист рецептора тромбозетина.

В других воплощениях домен IC из Тро wt заменен доменом IC подходящего рецептора, например, LMP1, IL2R, CD28 или CD137; примеры таких конструкций показаны как «ТроR. LMP1» «ТроR. IL2r β -cyt. ТроR-cyt» на фигуре 1 и как ТроRec.ТроRtm CD28cyto» и «ТроRec.ТроRtm CD137cyto» на фигуре 2.

ДОМЕН EC

Домен EC может быть доменом EC из ТроR (SEQ ID No: 1) или его производным или вариантом, который поддерживает передачу сигналов и пролиферацию клеток в ответ на связывание лиганда с рецептором.

Домен EC может не требоваться для передачи сигналов CrGFR, например, если используется домен TM, который может вызывать активацию рецептора при связывании лиганда, например, домен TM из ТроR. Тогда домен EC может быть укороченным или мутированным нативным доменом (например, без функции связывания лиганда), например, укороченным доменом EC из ТроR. Нативный домен EC может быть заменен маркером, таким как укороченный CD34, для отбора и/или мониторинга *in vivo*.

ДОМЕН TM

Можно использовать домен TM (показанный на фигуре 1) из рецептора Тро (ТроR), включая его производное или вариант, который поддерживает передачу сигналов и пролиферацию клеток в ответ на связывание лиганда с рецептором. Это может быть полезно, потому что известно, что ТроR имеет ограниченную экспрессию в нормальных тканях человека, а также известно, что он связывается с Элтромбопагом, Лусутромбопагом и Аватромбопагом, таким образом, CrGFR, содержащий домен TM из рецептора Тро, может быть активирован путем воздействия на клетки *in vitro* или *in vivo* с клинически подтвержденным соединением с известным профилем токсичности.

ДОМЕН IC

Можно использовать внутриклеточный (IC) домен рецептора фактора роста (представленный в SEQ ID No 1) из рецептора Тро, включая его производное или вариант, который поддерживает передачу сигналов и пролиферацию клеток в ответ на связывание лиганда с рецептором (например, укороченный сигнальный домен из ТроR, например, представленный в SEQ ID No 2). Он может быть объединен с доменом TM из рецептора

Тро для достижения хороших уровней пролиферации клеток в ответ на связывание лиганда.

Другие домены IC, которые являются рецепторами фактора роста, могут быть подходящими для применения при конструировании CrGFR по настоящему изобретению, поскольку известно, что эти рецепторы активируют те же пути передачи сигналов клетки, что и рецептор Тро. Например, домены IC из G-CSF, GM-CSF, пролактина или гормона роста человека можно использовать для конструирования CrGFR в сочетании с доменом ТМ из ТроR. Способность CrGFR, содержащего эти домены IC, индуцировать пролиферацию клеток в ответ на агонист рецептора, например, Элтромбопаг, затем может быть определена с использованием способов, описанных в приведенных в данном документе примерах. Домен IC из ТроR может быть укорочен до 79 аминокислот на С-конце. Было показано, что укорочения выше этого значения полностью нивелируют активность ТроR (Gurney et al. PNAS 1995).

Кроме того, домен IC может также содержать второй домен, происходящий из одного из следующего (без ограничения указанным): сигнальных доменов рецептора цитокинов (например, рецептора IL2), доменов косигнализации (например, CD40), вирусных онкогенных белков (например, LMP1), костимулирующих доменов (например, CD28, CD137, CD150 и т.д.) или других митогенных доменов (например, Toll-подобных рецепторов, иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов, сигнальных доменов CD3 и т.д.).

Цитокиновые рецепторы представляют собой широкую группу рецепторов, экспрессируемых на множестве типов клеток и участвующих в восприятии внеклеточных сигналов окружающей среды путем связывания с растворимыми цитокинами. Это событие связывания вызывает каскад передачи сигналов посредством передачи сигналов JAK/STAT, что приводит к усилению регуляции генов, участвующих в выживании и размножении. Такие рецепторы включают рецептор IL-2, рецептор IL-4 и рецептор тромбопоэтина (Liongue et al. 2016). Костимулирующие рецепторы - это белки, участвующие в повышении активности Т-клеток, когда клетка получает первичный сигнал через рецептор Т-клеток. Это основано на концепции Сигнала 1 и Сигнала 2, при этом Сигнал 1 доставляется посредством взаимодействия рецептора Т-клетки с пептидом-МНС, а сигнал 2 доставляется посредством взаимодействия костимулирующих рецепторов на Т-клетке с костимулирующими лигандами на клетки-мишени (например, дендритные клетки). Сигнал 2, доставляемый через костимулирующий домен, обеспечивает важные сигналы выживания для Т-клетки. Общие костимулирующие рецепторы включают CD28, CD137 и CD150 (Leitner et al. 2010). Термин

«косигнализация» определяет группы белков клеточной мембраны, которые обеспечивают поддерживающие сигналы, аналогичные описанным для костимулирующих рецепторов, но при определенных обстоятельствах могут обычно не считаться костимулирующими, поскольку они могут не экспрессироваться на Т-клетках, такие рецепторы включают CD40, который обычно экспрессируется в антигенпрезентирующих клетках, где увеличивает выживаемость при задействовании CD40-лиганда, экспрессированного на Т-клетках (He et al. 2012; Kumar et al. 2018).

Этот второй домен IC может быть слит непосредственно или через линкерный домен с С-концом первого домена IC (например, домен IC из ТроR, расположенный рядом с трансмембранным доменом Тро). Таким образом, рецептор химерного фактора роста может включать трансмембранный домен ТроR и домен IC из ТроR (первый домен IC) и второй домен IC, который может происходить из ТроR или может быть сигнальным доменом цитокинового рецептора, доменом косигнализации, вирусными онкогенными белками (например, LMP1) или костимулирующими доменами, подобными тем, которые обсуждались в предыдущем абзаце.

Кроме того, костимулирующий, коингибиторный или косигнальный домен может быть непосредственно слит с трансмембранным доменом ТроR для создания рецепторов, таких как те, что показаны на фигуре 2 и в SEQ ID No 13 и 14. Эти рецепторы могут содержать дополнительный (второй) домен IC, такой как домен ТроR.

КЛЕТКИ

Клетки, используемые в настоящем изобретении, могут быть любыми лимфоцитами, которые используются в адоптивной клеточной терапии, такими как Т-клетка или естественная клетка-киллер (NK), NKT-клетка, гамма/дельта-Т-клетка или регуляторная Т-клетка. Клетки могут быть аллогенными или аутологичными.

Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов, которые играют центральную роль в клеточном иммунитете. Их можно отличить от других лимфоцитов, таких как В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK-клетки), по наличию Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. Существуют различные типы Т-лимфоцитов, как описано ниже.

Цитотоксические Т-клетки разрушают инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки, а также вовлечены в отторжение трансплантата. CTL экспрессируют молекулу CD8 на своей поверхности. Эти клетки распознают свои мишени путем связывания с антигеном, ассоциированным с молекулой МНС класса I, которая присутствует на поверхности почти каждой клетки организма. Через IL-10, аденозин и другие молекулы, секретируемые регуляторными Т-клетками, CD8+ клетки могут быть

инактивированы до анергического состояния, что предотвращает аутоиммунные заболевания, такие как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит.

Т-клетки памяти - это подмножество антиген-специфических Т-клеток, которые сохраняются в течение длительного времени после исчезновения инфекции. Они быстро размножаются до большого количества эффекторных Т-клеток при повторном воздействии на их когнатный антиген, таким образом, обеспечивая иммунную систему «памятью» против прошлых инфекций. Т-клетки памяти включают три подтипа: центральные Т-клетки памяти (клетки ТСМ) и два типа эффекторных Т-клеток памяти (клетки ТЕМ и клетки ТЕМРА). Клетки памяти могут быть CD4⁺ или CD8⁺. Т-клетки памяти обычно экспрессируют белок клеточной поверхности CD45RO.

Регуляторные Т-клетки (Трег-клетки), ранее известные как Т-супрессоры, имеют решающее значение для поддержания иммунологической толерантности. Их основная роль - отключение опосредованного Т-клетками иммунитета к концу иммунной реакции и подавление аутореактивных Т-клеток, которые избежали процесса отрицательного отбора в тимусе.

Были описаны два основных класса CD4⁺ Трег-клеток - естественные Трег-клетки и адаптивные Трег-клетки.

Возникающие в природе Трег-клетки (также известные как CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Трег-клетки) возникают в тимусе и были связаны с взаимодействиями между развивающимися Т-клетками как с миелоидными (CD11c⁺), так и с плазмацитоидными (CD123⁺) дендритными клетками, которые были активированы с помощью TSLP. Встречающиеся в природе Трег-клетки можно отличить от других Т-клеток по наличию внутриклеточной молекулы под названием FoxP3.

Адаптивные клетки Трег (также известные как клетки Tr1 или клетки Th3) могут возникать во время нормального иммунного ответа.

Естественные клетки-киллеры (или NK-клетки) представляют собой тип цитолитических клеток, которые являются частью врожденной иммунной системы. NK-клетки обеспечивают быстрые ответы на врожденные сигналы от инфицированных вирусом клеток независимо от МНС.

NK-клетки (принадлежащие к группе врожденных лимфоидных клеток) определяются как большие гранулярные лимфоциты (LGL) и составляют третий тип клеток, дифференцированных из общего лимфоидного предшественника, генерирующего В- и Т-лимфоциты.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

В одном аспекте изобретения предложена последовательность нуклеиновой

кислоты по изобретению, кодирующая любой из CrGFR, полипептидов или белков, описанных в данном документе (включая их функциональные части и функциональные варианты).

Используемые в данном документе термины «полинуклеотид», «нуклеотид» и «нуклеиновая кислота» предназначены для обозначения синонимов друг друга.

Специалисту будет понятно, что множество различных полинуклеотидов и нуклеиновых кислот могут кодировать один и тот же полипептид в результате вырожденности генетического кода. Кроме того, следует понимать, что квалифицированные специалисты могут, используя стандартные методы, производить замены нуклеотидов, которые не влияют на полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидами, описанными в данном документе, чтобы отразить частоту использования кодонов любого конкретного организма-хозяина, в котором полипептиды должны быть экспрессированы, то есть, оптимизацию кодонов.

Нуклеиновые кислоты согласно изобретению могут включать ДНК или РНК. Они могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Они также могут быть полинуклеотидами, которые включают синтетические или модифицированные нуклеотиды. В данной области известен ряд различных типов модификации олигонуклеотидов. К ним относятся метилфосфонатные и фосфоротиоатные каркасы, добавление акридиновых или полилизиновых цепей на 3'- и/или 5'-концах молекулы. Для целей настоящего изобретения следует понимать, что полинуклеотиды можно модифицировать любым способом, доступным в данной области. Такие модификации могут быть выполнены для увеличения активности или продолжительности жизни интересующих полинуклеотидов *in vivo*.

Термины «вариант», «гомолог» или «производное» в отношении нуклеотидной последовательности включают любую замену, вариацию, модификацию, замену, делецию или добавление одной (или нескольких) нуклеиновой кислоты из или в последовательность.

Последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать последовательности белка, показанные в SEQ ID NO 3-14 или их варианты, включая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую или включающую укороченную форму рецептора Тро, такую как показана в SEQ ID NO 2.

Нуклеотидная последовательность может включать нуклеотидную последовательность ТроR, показанную в SEQ ID NO 17-28, или ее вариантах.

Изобретение также относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CrGFR, и

дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Т-клеточный рецептор (TCR) и/или химерный антигенный рецептор (CAR).

Последовательности нуклеиновых кислот могут быть объединены последовательностью, обеспечивающей совместную экспрессию двух или более последовательностей нуклеиновых кислот. Например, конструкция может содержать внутренний промотор, последовательность внутренней последовательности посадки рибосомы (IRES) или последовательность, кодирующую сайт расщепления. Сайт расщепления может быть самоотщепляющимся, так что, когда полипептид продуцируется, он немедленно расщепляется на отдельные белки без необходимости какой-либо внешней активности расщепления.

Известны различные сайты саморасщепления, включая сайт из вируса ящура (FMDV) и саморасщепляющийся пептид 2a.

Коэкспрессирующая последовательность может быть внутренней последовательностью посадки рибосомы (IRES). Коэкспрессирующая последовательность может быть внутренним промотором.

ВЕКТОРЫ

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает вектор, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты или конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению.

Такой вектор может быть использован для введения последовательности(ей) нуклеиновой кислоты или конструкции(ей) нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин так, чтобы она экспрессировала один или несколько CrGFR согласно первому аспекту изобретения и, необязательно, один или более других представляющих интерес белков (POI), например, TCR или CAR.

Вектор может быть, например, плазмидой или вирусным вектором, таким как ретровирусный вектор или лентивирусный вектор, или вектор на основе транспозона или синтетической мРНК. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долговременного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена или трансгенов и его размножение в дочерних клетках.

Вектор может быть способен к трансфекции или трансдукции лимфоцита, включая Т-клетку или НК-клетку.

Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые вставлена нуклеиновая кислота настоящего изобретения.

Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих

CrGFR и, необязательно, TCR или CAR, обычно достигается путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды CrGFR и TCR/CAR или их частей, с одним или несколькими промоторами и включения конструкции в экспрессирующий вектор. Векторы могут подходить для репликации и интеграции в эукариотических клетках. Типичные клонирующие векторы включают терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, полезные для регуляции экспрессии искомой последовательности нуклеиновой кислоты.

Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, например, в Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) и в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии, см. также WO 01/96584; WO 01/29058; и Пат. США No 6326193).

В некоторых воплощениях конструкции нуклеиновых кислот показаны на фигурах в данном документе. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты представляют собой мультицистронные конструкции, которые позволяют экспрессию множества трансгенов (например, CrGFR, TCR и/или CAR и т.д.) под контролем одного промотора. В некоторых воплощениях трансгены (например, CrGFR, TCR и/или CAR и т.д.) разделены самоотщепляющимся пептидом 2A. Примеры пептидов 2A, используемых в конструкциях нуклеиновых кислот по изобретению, включают F2A, P2A, T2A и E2A. В других воплощениях изобретения конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению представляет собой мультицистронную конструкцию, содержащую два промотора; один промотор управляет экспрессией CrGFR, а другой промотор управляет экспрессией TCR или CAR. В некоторых воплощениях конструкции с двойным промотором по изобретению являются однонаправленными. В других воплощениях конструкции с двойным промотором по изобретению являются двунаправленными.

Чтобы оценить экспрессию полипептида CrGFR или его частей, экспрессирующий вектор, который должен быть введен в клетку, может также содержать либо селектируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо оба, чтобы облегчить идентификацию и отбор экспрессирующих клеток из популяции клеток, которую пытались трансфицировать или трансдуцировать вирусными векторами. Полипептид CrGFR может включать маркер, такой как CD34, как часть домена EC.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей вектор или клетку, экспрессирующую CrGFR, по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксцipientом и необязательно одним или несколькими дополнительными фармацевтически активными

полипептидами и/или соединениями. Такая композиция может, например, быть в форме, подходящей для внутривенного вливания.

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

Клетки, включая Т- и НК-клетки, экспрессирующие CrGFR для применения в способах настоящего изобретения, могут быть созданы *ex vivo* либо из собственной периферической крови пациента (аутологичной), либо в условиях трансплантации гемопоэтических стволовых клеток из периферической крови донора, либо периферической крови из несвязанного донора (аллогенной). Альтернативно, Т-клетки или НК-клетки могут быть получены в результате дифференцировки *ex vivo* индуцибельных клеток-предшественников или эмбриональных клеток-предшественников в Т-клетки или НК-клетки. В этих случаях Т-клетки, экспрессирующие CrGFR, и необязательно CAR и/или TCR получают путем введения ДНК или РНК, кодирующих CrGFR и необязательно CAR и/или TCR одним из многих способов, включая трансдукцию с помощью вирусного вектора, трансфекцию ДНК или РНК.

Т- или НК-клетки, экспрессирующие CrGFR по настоящему изобретению и необязательно экспрессирующие TCR и/или CAR, могут быть использованы для лечения гемобластозов или солидных опухолей.

Способ лечения заболевания относится к терапевтическому применению вектора или клетки, включая Т- или НК-клетку, по настоящему изобретению. В этом отношении вектор или Т- или НК-клетку можно вводить объекту, имеющему существующее заболевание или состояние, чтобы уменьшить, ослабить или улучшить по меньшей мере один симптом, связанный с заболеванием, и/или замедлить, ослабить или заблокировать прогрессирование болезни. Способ по изобретению может вызывать или способствовать опосредованному Т-клетками уничтожению злокачественных опухолевых клеток.

Вектор или Т- или НК-клетку в соответствии с настоящим изобретением можно вводить пациенту с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Пациенту можно одновременно вводить один или несколько дополнительных терапевтических агентов. Под «одновременным введением» подразумевается введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов и вектора, или Т- или НК-клетки по настоящему изобретению, достаточно близко по времени, так что вектор, или Т- или НК-клетка может усиливать эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, или наоборот. В этом отношении векторы или клетки можно вводить первыми, а одно или несколько дополнительных терапевтических агентов можно вводить вторыми, или наоборот. Альтернативно, векторы или клетки и один или несколько дополнительных терапевтических агентов можно вводить одновременно.

Подходящие терапевтические агенты, которые можно вводить совместно с векторами или клетками по настоящему изобретению, включают любой агонист рецептора фактора роста, который активирует cGFR, например, Элтромбопаг (rINN, кодовое название SB-497115-GR), Лусутромбопаг и Аватромбопаг или Ромиплостим.

Элтромбопаг может быть особенно полезен в способах по изобретению, поскольку его профиль токсичности известен. В доклинических исследованиях было показано, что соединение селективно взаимодействует с рецептором тромбопоэтина, что приводит к активации сигнального пути JAK-STAT и увеличению пролиферации и дифференцировки мегакариоцитов. Исследования на животных подтвердили, что введение может увеличить количество тромбоцитов. У 73 здоровых добровольцев более высокие дозы Элтромбопага вызывали большее увеличение количества циркулирующих тромбоцитов без проблем с переносимостью, см., например, Jenkins JM, Williams D, Deng Y, Uhl J, Kitchen V, Collins D, Erickson-Miller CL (Jun 2007). "Phase 1 clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist". Blood 109 (11): 4739–41. Таким образом, в способах по изобретению подходящие дозировки Элтромбопага могут быть определены на основании ранее опубликованных клинических исследований и анализов *in vitro*, описанных в данном документе.

Другим агентом, который может быть полезен, является ИЛ-2, поскольку он в настоящее время используется в существующих клеточных терапиях для повышения активности вводимых клеток. Однако, как указывалось ранее, лечение ИЛ-2 связано с проблемами токсичности и переносимости. Таким образом, целью настоящего изобретения является стимуляция пролиферации клеток с помощью агониста, который связывается с cGFR, и, следовательно, снижает количества ИЛ-2, которое необходимо вводить (например, до уровней, которые менее токсичны), или даже устранение необходимости во введении ИЛ-2.

Для целей способов по настоящему изобретению, в которых клетки вводят пациенту, клетки могут быть клетками, которые являются аллогенными или аутологичными для пациента.

Различные дополнительные аспекты и воплощения настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом настоящего раскрытия.

Все документы, упомянутые в этом описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

«И/или» в контексте настоящего описания следует понимать как конкретное раскрытие каждой из двух указанных функций или компонентов вместе или без друг друга. Например, «А и/или В» следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого

из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждое из них изложено в данном документе отдельно.

Если контекст не диктует иное, описания и определения признаков, изложенных выше, не ограничиваются каким-либо конкретным аспектом или воплощением изобретения и в равной степени применимы ко всем аспектам и воплощениям, которые описаны.

Некоторые аспекты и воплощения изобретения теперь будут проиллюстрированы в качестве примера и со ссылкой на фигуры, описанные выше, и таблицы, описанные ниже.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Производство и оценка Т-клеток, экспрессирующих CrGFR

Материалы и методы

Плазмиды

Плаزمида pSF.Lenti.EF1 α была создана Oxford Genetics путем замены существующего промотора CMV в pSF.Lenti.CMV.PGK.puro промотором фактора элонгации (EF)1 α для создания pSF.Lenti.EF1 α .PGK.puro. Затем сегмент PGK.Puro удаляли, а конструкции TroR клонировали посредством гидролиза XbaI/NheI с сайтом NheI ниже гена устойчивости к пурамицину. Упаковывающие плазмиды pVSVg, pCgpV и pRSV.Rev (система упаковки ViraSafe Lentiviral - Pantropic) были получены от Cell Biolabs (VPK-206).

Реактивы

Следующие реактивы были получены от следующих производителей:

Abcam – DRAQ7 (AB109202-1ml)

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

BD Biosciences - анти-CD34-PE (555822);

E-Biosciences - Fixable Viability dye eFlor 450 (65-0863-18), Fixable Viability dye eFlor 780 (65-0865-18),

Клеточные линии

Клеточную линию Jurkat E6.1 и клеточную линию Va/F3 культивировали в RPMI с добавлением 10% FCS (F9665-500 мл: Sigma), 1% 1M HEPES (H0887-100 мл) и 1% пенициллина/стрептомицина (P0781-100 мл). (Т-клеточная среда: TCM). Клеточную линию 293T и обычно культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FCS и 1% пенициллина/стрептомицина (P0781-100 мл) (D10).

Выделение Т-клеток

Т-клетки выделяли из PBMC из лейкоцитов. Вкратце, лейкоцитарную пленку

получали из NHSBT, а РВМС выделяли центрифугированием в градиенте плотности, опосредованным фиколлоном. Нетронутые Т-клетки выделяли с помощью парамагнитных гранул (см. ниже). Т-клетки культивировали в RPMI с добавлением 10% FCS (F9665-500 мл: Sigma), 1% 1M HEPES (H0887-100 мл) и 1% пенициллина/стрептомицина (P0781-100 мл) (Т-клеточная среда: TCM).

Получение лентивирусов

6×10^6 клеток 293Т высевали в 10 мл D10 за день до трансфекции в покрытом поли-d-лизином флаконе T75 (Greiner). В день трансфекции готовили 0,025 М забуференную HEPES бессывороточную среду DMEM (pH 7,1) и 0,025 М забуференную HEPES D10 (pH 7,9). Для каждой колбы готовили 1,5 мл смеси для трансфекции, используя 10 мкг лентивирусной плазмиды для переноса (pSF.Lenti) и по 10 мкг каждой из pVSVg, pCgpV и pRSV.Rev и CaCl₂ до конечной концентрации 0,05 М в среде с pH 7,1. Трансфекционным комплексам давали возможность сформироваться в течение 30 минут перед их добавлением по каплям в колбы, содержащие 6 мл среды pH 7,9. Через 24 ч среду заменяли на 10 мл свежего D10. Через 24 и 48 часов среду собирали, объединяли и концентрировали с применением концентратора Lenti-X (Clontech-Takara: 631232). Концентрированные лентивирусные частицы ресуспендировали в 10-кратном размере исходной надосадочной жидкости и хранили при -80°C до использования.

Трансдукция Т-клеток

Добавляли 1×10^5 Т-клеток на лунку 96-луночного планшета с плоским дном. Планшет центрифугировали и надосадочную жидкость аспирировали перед добавлением 50-100 мкл лентивирусной надосадочной жидкости с добавлением 4 мкг/мл полибрена (гексадиметринбромид - Sigma: H9268-5G) и IL-2 в указанной концентрации. В некоторых случаях добавляли реагенты активации: Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Fisher: 11131D), Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28/CD137 (Thermo Fisher 11162D) в концентрациях, рекомендованных производителем.

Парамагнитные сорта гранул

Сортировка парамагнитных гранул проводилась в соответствии с инструкциями производителей с применением либо анти-PE микрогранул (Miltenyi Biotec или StemCell Technologies), либо гранул для выделения Т-клеток (17951: StemCell Technologies).

Протокол быстрого размножения (REP)

Т-клетки размножали с применением облученных фидеров из лейкоцитарной пленки. Вкратце, из NHSBT получали 10 облученных лейкоцитарных пленок, РВМС выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла смешивали и замораживали. Размороженные фидеры из лейкоцитарной пленки смешивали с Т-

клетками в соотношении 1:20 - 1:100 до конечной концентрации клеток 1×10^6 /мл в TCM + 200 МЕ/мл IL-2 и 1 мкг/мл фитогемагглютинина в культуральном флаконе T25. Вертикальный флакон помещали под углом 45° в течение первых пяти дней, после чего колбу возвращали в вертикальное положение и проводили замену половины среды по объему. Замену среды выполняли каждые 2-3 дня со свежим IL-2, добавленным до конечной концентрации 200 МЕ/мл в течение 14 дней, после чего клетки криоконсервировали или сразу использовали в анализе.

Дизайн конструкций

Ранее мы подтвердили, что TroR может проявлять активность в первичных Т-клетках человека. Однако попытки изменить рецептор не всегда были простыми. Например, гибриды между доменом Ec из TroR и доменом IC из GCSF не смогли экспрессироваться на поверхности клетки. Более того, гибриды рецепторов пролактина, по-видимому, не были полностью поверхностно стабильными. Кроме того, мы полагали, что можем улучшить сигнальную способность рецепторов на основе TroR в Т-клетках, включив сигнальные компоненты, которые активируют JAK3, сигнальную молекулу, участвующую в передаче сигналов IL-2, но не в передаче сигналов TroR, и, следовательно, с большей вероятностью управляют IL-2-подобными сигналами в сконструированных клетках.

Поэтому мы стремились создать гибридные рецепторы, в которых дополнительные домены были слиты непосредственно с С-концом домена IC из TroR. Сначала мы создали гибрид TroR и сигнального домена IL2 γ β. Предыдущие попытки создания гибрида между TroR и IL2 γ β путем полного удаления внутриклеточного домена TroR приводили к рецепторам, которые не экспрессировались достаточно хорошо. Поэтому мы выбрали альтернативный подход, в котором был создан гибридный сигнальный домен TroR-IL2 γ β, посредством которого сигнальный участок IL2 γ β был слит на N- или С-конце с сигнальным доменом TroR. Затем мы создали рецепторы, в которых цитоплазматический домен TIAF1, TLR1, CD150, IL2 γ , CD40, LMP1 и ITAM1 из CD3 ζ был слит с С-концом с сигнального домена TroR. Причина выбора этих рецепторов заключалась в следующем: в отношении TIAF1 есть данные о том, что он связывает JAK3 (Ji et al. 2000); в отношении TLR1/CD40 было показано, что синергизм между TLR и CD40 индуцирует размножение Т-клеток (Ahonen et al. 2004), кроме того, было показано, что CD40 связывается с JAK3 и требует JAK3 для передачи сигналов в В-клетках (Hanissian & Geha 1997); в отношении CD150 есть данные о том, что CD150 может защищать Т-клетки от депривации IL-2 (Aversa et al. 1997); что касается ITAM1, то мы решили объединить одиночный ITAM из CD3 ζ с С-концом TroR, чтобы вызвать митогенный ответ; Было показано, что LMP1, а

именно, LMP1 вируса EBV взаимодействует с JAK3 (Gires et al. 1999), дополнительно мы также объединили LMP1 непосредственно с трансмембранным доменом TroR, поскольку мы полагали, что гибрид с цитоплазматическим доменом TroR будет довольно большим и может не экспрессироваться достаточно хорошо. Мы также создали CrGFR, состоящий из внеклеточного и трансмембранного домена TroR, слитого с цитоплазматическим доменом CD28 и CD137, поскольку мы полагали, что они будут обеспечивать костимуляторный сигнал для роста при введении Элтромбопага, последовательности этих конструкций представлены ниже.

Конструкции клонировали в pSF.Lenti (Oxford Genetics) через сайты XbaI и NheI. Все фрагменты и конструкции были оптимизированы по кодонам, ген синтезирован и клонирован Genewiz.

Продуцирование лентивирусов. Продуцирование лентивирусов выполняли с применением системы упаковки из трех плазмид (Cell Biolabs, Сан-Диего, США) путем смешивания 10 мкг каждой плазмиды плюс 10 мкг плазмиды pSF.Lenti lentiviral, содержащей трансген, вместе в бессывороточной RPMI, содержащей 50 мМ CaCl₂. Смесь по каплям добавляли к 50% конфлюэнтному монослою клеток 293T во флаконах на 75 см². Вирусные надосадочные жидкости собирали через 48 и 72 часа после трансфекции, объединяли и концентрировали с применением раствора для концентрации лентивирусной надосадочной жидкости LentiPac (GeneCorporcia, Роквилл, Мэриленд, США) в соответствии с инструкциями производителя. Лентивирусные надосадочные жидкости десятикратно концентрировали и использовали для непосредственного заражения первичных Т-клеток человека в присутствии 4 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, Дорсет, Великобритания).

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из нормальных здоровых доноров перед активацией в течение 24 часов с помощью гранул для активации и размножения Т-клеток (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя перед добавлением лентивирусных надосадочных жидкостей.

После размножения клетки промывали избыточно для удаления любого экзогенного IL2 и помещали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. В клетки добавляли IL2 (Пролейкин) или Элтромбопаг (Strattech Scientific, Саффолк, Великобритания). После этого в различные моменты времени клетки либо окрашивали раствором фиксируемого красителя для определения жизнеспособности eFlor-450 (1: 400) (eBioscience, Великобритания) и подсчитывали непосредственно из лунок с помощью цитометра MACSQuant, либо окрашивали красителем жизнеспособности DRAQ7 и конъюгированным с фикоэритрином анти-CD110-антителом (Miltenyi Biotec, Великобритания) и анализировали с помощью цитометра MACSQuant. Затем

жизнеспособность клеток и/или уровень трансдукции анализировали с применением программного обеспечения MACSQuantify (Miltenyi Biotec, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первоначально мы протестировали функциональность и профили экспрессии CrGFR по сравнению с рецептором wt в клетках Jurkat E6.1 и Va/F3, которые являются линией Т-клеточной лимфомы человека и IL-3-зависимой линией В-клеток мыши, соответственно. Хотя Va/F3 не являются ни человеческими, ни Т-клетками, они, по меньшей мере, покажут, могут ли рецепторы правильно складываться и экспрессироваться и способны ли они передавать сигнал. Были изготовлены лентивирусные частицы, которые использовали для прямого заражения клеток Jurkat E6.1 и Va/F3. Клетки Jurkat анализировали через 48 часов на экспрессию с применением конъюгированного с PE анти-CD110-антитела. Клетки Va/F3 инкубировали с Элтромбопагом или мышиним IL-3 и экспрессию CrGFR оценивали в течение нескольких дней с помощью анализа экспрессии CD110 с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фигуре 4, все рецепторы могут быть успешно обнаружены в клетках Jurkat E6.1, хотя три рецептора (TroR.SLAM, TroR.TIAF1 и TroR.IL2r β -cyt.TroR-cyt) имели низкий профиль экспрессии, что позволяет предположить, что они не очень хорошо экспрессируются на поверхности. В клетках Va/F3 экспрессируются все рецепторы, и популяция может быть обогащена добавлением Элтромбопага, но не IL-3, как предполагалось (фигура 5). Однако два гибридных рецептора IL2r β , хотя и могут быть обогащены в популяции, имели плохой профиль выживаемости в Va/F3, и анализ этих рецепторов пришлось прервать из-за отсутствия жизнеспособных клеток.

Затем мы взяли эти рецепторы, экспрессировали их в первичных Т-клетках человека и подвергли эти клетки действию IL-2 или Элтромбопага. Три донорные первичные популяции Т-клеток человека были выделены из лейкоцитов и трансдуцированы указанными лентивирусными конструкциями в присутствии CD3/CD28 Dynabeads. После размножения клетки инкубировали с IL-2 или Элтромбопагом. Результаты показаны на фигурах 6, 7 и 8 (x3 доноры). Мы наблюдали увеличение роста/выживания Т-клеток с некоторыми рецепторами у некоторых доноров. Мы проанализировали этот набор данных в целом, посмотрев на долю клеток, экспрессирующих хорошую долю жизнеспособных клеток с отдельной популяцией CD110+ клеток через 21 день. Это сузило нашу панель рецепторов для дальнейшего анализа до: TroR.CD40, TroR.IL2r γ , TroR.ITAM1, TroR.LMP1-cyt и TroR.TroR-cyt-LMP1-cyt. TroR. Δ 60 также выглядел хорошо, но у нас не было изначально идеи включать его в гибридные рецепторы более позднего поколения далее.

Затем мы повторили эксперимент, но отсортировали клетки CrGFR⁺ с применением отбора по CD110⁺ путем отбора с помощью парамагнитных гранул с применением рецепторов, идентифицированных в первом раунде отбора (фигуры 10, 11 и 12). Мы наблюдали повышенную выживаемость Т-клеток, привитых большей частью CrGFR, у всех трех доноров. В частности, мы наблюдали рост клеток WT-TroR, TroR.CD40, TroR.IL2 γ и TroR.LMP1-cyto у второго донора (фигура 12) выше, чем при использовании только среды.

Затем мы оценили способность этих рецепторов способствовать выживанию/расширению на модели адоптивной клеточной терапии путем конструирования лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. TIL из пациента TIL042 (увеальная меланома) были сконструированы с вариантом CrGFR или с CrGFR дикого типа и смешаны с опухолевыми клетками, соответствующими пациентам (CTUM42.1). На 4 и 7 дни подсчитывали все клетки, а также клетки CD110⁺. Мы обнаружили первоначальное снижение количества клеток, вероятно, вызванное AICD или внутренними тормозными факторами. Однако между 4 и 7 днями мы наблюдали увеличение числа CD110⁺ клеток со всеми рецепторами, протестированными с Элтромбопагом или Элтромбопагом + низкие дозы IL-2. При этом эффект TroR.CD40 был обнадеживающим, поскольку не продемонстрировал неспецифического обогащения на фоне отдельного IL2, эффекта, наблюдаемого с другими тестируемыми рецепторами.

Мы дополнительно оценили влияние CrGFR на TIL яичников. Были сконструированы три популяции TIL яичников для экспрессии рецепторов либо дикого типа (WT), либо TroR.CD40, TroR.IL2 γ или TroR.LMP1-Cyt, и были смешаны с опухолевыми клетками, соответствующими пациентам, в присутствии или в отсутствии Элтромбопага. Подсчет общего количества клеток и клеток CD110⁺ производился через 4 и 7 дней. Мы наблюдали специфическое размножение клеток CrGFR⁺ в присутствии опухоли между 4 и 7 днями у доноров 2 и 3 со всеми рецепторами, кроме TroR.LMP1.cyt. У донора 1 мы обнаружили, что, хотя не было специфического размножения клеток CrGFR⁺, добавление Элтромбопага, по-видимому, защищало клетки от AICD (гибели клеток, вызванной активацией). Важно отметить, что мы обнаружили, что у всех трех доноров активность вариантов TroR.IL2 γ и TroR.CD40 превышала активность рецептора WT (Фигура 13).

Наконец, мы подтвердили сигнальный потенциал нового CrGFR, проведя фосфо-STAT-анализ после обработки CrGFR-экспрессирующих Т-клеток средой, цитокином или лекарственным средством. С этой целью Т-клетки от 4 доноров трансдуцировали либо TroR дикого типа, TroR. CD40 либо TroR.IL2 γ , обогащали для экспрессии CrGFR с

применением протоколов отбора на парамагнитных гранулах, а затем размножали с применением поликлональной стимуляции. Клетки обрабатывали в течение четырех часов только средой (RPMI), IL-2, Тро или Элтромбопагом (Elt) перед фиксацией метанолом, пермеабиллизацией и анализом с применением специфических антител к pSTAT. Молекулы STAT являются ключевыми факторами передачи клеточных сигналов при активации клеток цитокинами, в частности pSTAT5 является ключом к активности IL-2. Действительно, мы наблюдали индукцию pSTAT5 при инкубации с IL-2, но не со средой. IL-12 в качестве контроля не может вызвать активацию STAT5, как это наблюдалось в этом эксперименте. Тро и Элтромбопаг, в частности, показали индукцию активности STAT5. Это было наиболее четко видно на примере CrGFR ТроR.IL2γ, демонстрирующего четкую активацию правильного пути активации STAT5 при стимуляции Элтромбопагом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецепторы факторов роста, реагирующие на клинически доступные лекарственные средства, могут быть перенесены в Т-клетки с помощью технологии переноса генов и при этом сохранить свою функциональную способность доставлять сигналы роста/выживания клеток. Важно отметить, что, как в примере, первичные человеческие Т-клетки с привитым CrGFR на основе ТроR реагируют на клинически доступное лекарственное средство Элтромбопаг, размножаются и выживают в отсутствие IL-2, который обычно необходим для оптимального роста Т-клеток.

В данном документе мы протестировали ряд функциональных вариантов; на основе ТроR, слитого с сигнальными доменами ряда костимулирующих или косигнальных молекул или рецепторов других факторов роста. Мы показали, что эти рецепторы обеспечивают независимый от IL-2 рост и выживание в первичных человеческих Т-клетках и в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, в присутствии агониста ТроR Элтромбопага. В частности, мы обнаружили, что слитый с ТроR.CD40 CrGFR обеспечивает очень специфическое опосредованное Элтромбопагом выживание/размножение TIL и показывает оптимальную активность в первичных Т-клетках человека.

Аспекты и воплощения изобретения также изложены в следующих пунктах:

1. Т-или НК-клетка, содержащая химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR), включающий:

- (i) внеклеточный (EC) домен;
- (ii) трансмембранный (TM) домен тромбopoэтина; и
- (iii) внутриклеточный (IC) домен химерного рецептора фактора роста.

2. Т-или NK-клетка по пункту 1, где связывание лиганда с CrGFR индуцирует пролиферацию Т- или NK-клетки.

3. Т-или NK-клетка по пункту 2, где лиганд представляет собой человеческий тромбопоэтин, агонист рецептора тромбопоэтина или ассоциированный с опухолью антиген.

4. Т-или NK-клетка по пункту 3, где агонист рецептора тромбопоэтина связывается с доменом ТМ.

5. Т-или NK-клетка по пункту 3 или 4, где агонист рецептора тромбопоэтина выбран из Элтромбопага и Ромиплостима.

6. Т-или NK-клетка по предшествующим пунктам, где домен ЕС включает домен ЕС c-mpl человека.

7. Т-или NK-клетка по предшествующим пунктам, где домен ЕС включает один или несколько из числа i) укороченного домена ЕС, ii) укороченного домена ЕС из c-mpl, iii) домена, который связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью, iv) антитела или фрагмента антитела, которое связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью; и v) селекционного маркера.

8. Т-или NK-клетка по предшествующим пунктам, где домен IC включает костимулирующий, коингибиторный или косигнальный домен, полученный из любой костимулирующей, коингибиторной или косигнальной молекулы, такой как - без ограничения указанным - CD2, CD27, CD28, CD29, CD134, CD137, CD150, PD1 и т.д.

9. Т-или NK-клетка по предшествующим пунктам, где первый домен IC выбран из: рецептора гормона роста человека, рецептора пролактина человека, рецептора тромбопоэтина человека (c-mpl), рецептора G-CSF или рецептора GM-CSF.

10. Т-или NK-клетка по предшествующим пунктам, где дополнительный домен IC выбран из рецептора гормона роста человека, рецептора пролактина человека, рецептора тромбопоэтина человека (c-mpl), рецептора G-CSF или рецептора GM-CSF, или костимулирующего рецептора, или рецептора косигнализации. Кроме того, домен IC также включает второй домен, происходящий из одного из следующих (без ограничения указанным): сигнальных доменов рецептора цитокинов (например, рецептора IL2), доменов косигнализации (например, CD40), вирусных онкогенных белков (например, LMP1), костимулирующих доменов. (например, CD28, CD137, CD150 и т.д.) или других митогенных доменов (например, Toll-подобных рецепторов, иммунорецепторных мотивов активации на основе тирозина, сигнальных доменов CD3 и т.д.). Этот второй домен сливается непосредственно или через линкерный домен с С- или N-концом домена IC из TroR.

10. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, имеющая домен ТМ рецептора тромбопоэтина человека или его вариант, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, который связывает тромбопоэтин человека или агонист рецептора тромбопоэтина.

11. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, в которой CrGFR включает последовательность, показанную как SEQ ID No 3, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

12. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 4, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность реагировать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

13. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 5, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

14. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 6, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

15. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 7, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

16. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит

последовательность, показанную как SEQ ID No 8, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

17. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, в которой CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 9, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

18. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 10, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

19. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 11, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

20. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, в которой CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 12, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с доменом IC из TroR, укороченным на С-конце вплоть до 79 аминокислот, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать на синтетический агонист, такой как Элтромбопаг,

21. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 13, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с альтернативным доменом EC, который сохраняет способность отвечать синтетическому агонисту, такому как Элтромбопаг,

22. Т-или НК-клетка по предшествующим пунктам, где CrGFR содержит

последовательность, показанную как SEQ ID No 14, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80% на уровне белка, или с альтернативным доменом EC, который поддерживает способность отвечать синтетическому агонисту, такому как Элтромбопаг,

23. AT или NK-клетка по предшествующим пунктам, которая содержит последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 3–14, или ее вариант, который имеет, по меньшей мере, 80% идентичности последовательности, но сохраняет способность i) связываться с человеческим тромбопоэтином, или агонистом рецептора тромбопоэтина человека; и ii) индуцировать пролиферацию или выживание клеток

24. T-клетка или NK-клетка по любой из предшествующих клаузул, которая связывается с Элтромбопагом.

25. T-клетка или NK-клетка по любой из предшествующих клаузул, где T-клетка выбрана из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), регуляторных T-клеток (Treg) или первичных T-клеток.

26. T-клетка или NK-клетка по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая рекомбинантный T-клеточный рецептор (TCR) и/или химерный антигенный рецептор (CAR).

27. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CrGFR по любому из предшествующих пп.

28. Последовательность нуклеиновой кислоты по пункту 27, которая включает последовательность, показанную как SEQ ID No 17-28, или ее вариант, который не изменяет транскрибируемую последовательность белка.

29. Последовательность нуклеиновой кислоты по пункту 27, которая включает последовательности, показанные в SEQ ID 3-12, но с доменом IC, показанным в SEQ ID No 2.

30. Вектор, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты по пунктам 27-29, или любой ее вариант, который не изменяет транскрибируемую последовательность белка.

31. Способ получения T-клетки или NK-клетки по любому из пунктов 1-26, который включает стадию введения нуклеиновой кислоты в соответствии с пунктами 27-29 или вектора в соответствии с пунктами 19-28 в T-клетку или NK-клетку.

32. Фармацевтическая композиция, которая содержит вектор по пункту 30 или T- или NK-клетку по пунктам 1-26 вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом.

33. Способ размножения клеток *in vivo*, включающий введение объекту клеток по

пп. 1-26 или фармацевтической композиции по п. 32.

34. Способ размножения клеток *in vivo* по пункту 33, включающий введение объекту тромбopoэтина или агониста рецептора тромбopoэтина, такого как Элтромбопаг или ромиплостим.

35. Т-или НК-клетка по любому из пунктов 1-26 или вектор по пункту 30 для применения в адоптивной клеточной терапии.

36. Т-или НК-клетка по любому из пунктов 1-26 или вектор по пункту 30 для применения в способе лечения онкологических заболеваний.

37. Способ лечения рака, который включает стадию введения объекту Т-клетки или НК-клетки в соответствии с любым из пунктов 1-26.

38. Применение вектора по пункту 30 или Т-или НК-клетки по любому из пунктов 1-26 при производстве лекарственного средства для лечения рака.

39. Элтромбопаг для применения в адоптивной клеточной терапии.

40. Элтромбопаг для применения при размножении *in vitro* или *in vivo* Т- или НК-клеток по любой из клаузул 1-26.

41. Композиция, содержащая Т-или НК-клетку по пунктам 1-26, для применения в комбинации с тромбopoэтином или агонистом рецептора тромбopoэтина при лечении рака.

Список литературы

Ahonen CL, Doxsee CL, McGurran SM, Riter TR, Wade WF, Barth RJ, Vasilakos JP, Noelle RJ, Kedl RM. *J Exp Med.* 2004 Mar 15;199(6):775-84. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN.

Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. *J Immunol.* 1997 May 1;158(9):4036-44. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production.

Columbyova L, Loda M, Scadden DT. *Cancer Res.* 1995 Aug 15;55(16):3509-12. Thrombopoietin receptor expression in human cancer cell lines and primary tissues.

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.* 2013 Apr 18;368(16):1509-18. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia.

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.

Stem Cells. 2009 Feb;27(2):424-30. Preclinical activity of eltrombopag (SB-497115), an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist.

Fox NE, Lim J, Chen R, Geddis AE. *Exp Hematol*. 2010 May;38(5):384-91. F104S c-Mpl responds to a transmembrane domain-binding thrombopoietin receptor agonist: proof of concept that selected receptor mutations in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia can be stimulated with alternative thrombopoietic agents.

Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, Baumann M, Kieser A, Kaiser C, Zeidler R, Scheffer B, Ueffing M, Hammerschmidt W. *EMBO J*. 1999 Jun 1;18(11):3064-73. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins.

Hanissian SH, Geha RS. *Immunity*. 1997 Apr;6(4):379-87. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells.

Kawahara M, Kimura H, Ueda H, Nagamune T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 27;315(1):132-8. Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera.

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. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor.

Jin L, Zeng H, Chien S, Otto KG, Richard RE, Emery DW, Blau CA.

Nat Genet. 2000 Sep;26(1):64-6. In vivo selection using a cell-growth switch.

Ji H, Zhai Q, Zhu J, Yan M, Sun L, Liu X, Zheng Z. A novel protein MAJN binds to Jak3 and inhibits apoptosis induced by IL-2 deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Apr 2;270(1):267-71.

Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T. *Cytokine*. 2011 Sep;55(3):402-8. Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera.

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):126-9. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.

Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, Hasegawa M. *J Gene Med*. 2004 Jan;6(1):22-31. In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene utilizing the erythropoietin receptor as a molecular switch.

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*. 2017 Dec 21;130(25):2739-2749. c-MPL provides tumor-targeted T-cell receptor-transgenic T cells with costimulation and cytokine signals.

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*. 2015 Aug;21(8):914-21. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma.

Richard RE, Wood B, Zeng H, Jin L, Papayannopoulou T, Blau CA. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):430-6. Expansion of genetically modified primary human hemopoietic cells using chemical inducers of dimerization.

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*. 2011 Jul 1;17(13):4550-7. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.

Saka K, Kawahara M, Teng J, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T. *J Biotechnol*. 2013 Dec;168(4):659-65. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells.

Saka K, Kawahara M, Ueda H, Nagamune T. *Biotechnol Bioeng*. 2012 Jun;109(6):1528-37. Activation of target signal transducers utilizing chimeric receptors with signaling-molecule binding motifs.

Yamane N, Tanaka Y, Ohyabu N, Yamane S, Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 31;586(1-3):44-51. Characterization of novel non-peptide thrombopoietin mimetics, their species specificity and the activation mechanism of the thrombopoietin receptor.

Последовательности

В аминокислотных последовательностях ниже жирным шрифтом обозначена последовательность из TrpR.

В приведенных ниже нуклеотидных последовательностях вырожденные основания указаны с применением стандартного кода IUPAC:

Код нуклеотида IUPAC	Основание	Код нуклеотида IUPAC	Основание
A	Аденин	K	G или T
C	Цитозин	M	A или C

G	Гуанин	В	С или G или Т
Т (или U)	Тимин (или урацил)	D	А или G или Т
R	А или G	Н	А или С или Т
Y	С или Т	V	А или С или G
S	G или C	N	любое основание
W	А или Т	. или -	разрыв

** обозначает стоп-кодоны

Трансмембранный домен подчеркнут (в SEQ ID NO: 1-15)

SEQ ID No 1: TroR дикого типа.

635 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TroR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен ТМ из TroR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TroR.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTEFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
PKQTPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGSWSLPVTV
DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARC CPRDRYPIWE
NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLEPPLG
ARGGTLELRPRSRYLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
*CCTTHIANHSYLPLSYWQQP*****

SEQ ID No15: TroR дикого типа

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
argcngcncnwsnggnacntaycarytnyntaygcntayccnmngngaraarccnmngngcntgyccnytnwsnwsncarwsn
atgccncayttyggnacnmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnynttytccnytncaaytntgggtnaaraa
ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
atggnggnwsncarccngngarytnicarathwsntgggargargcngcncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
rmgncncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygncarccnacnatgccntggcargayggncnaarcaracnw
snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaaywsntaytg
gytnarytnmgngnwsngarccngayggngathwsnytnngnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtnayytn

ccngngaygcngtngcnytnngnytncartgyttyacnytnngayynaaraaygtnacntgycartggcarcarcargaycaycgn
 wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngncnmngntgytgyccnmngngaymngntayccnathtgggaraayt
 gygargargaraaracnaayccnggnytnaracnccncarttywsnmngntgycayttyaarwsnmngnaaygaywsnathat
 hcayathytngtngargtnacnacngcncnggnacngtncaywsntaytnggnwsncnttytgathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacnccnaaytncaytggmgngarathwsnwsnggncaaytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggcn
 cargaracntgytaycarytnmngntayacngngarggncaycargaytggargtngarccnccnytnngngcnmngngng
 gnacnytngarytnmgnccnmgnwsnmngntaymngnytnarytnmngncnmngnytnaayggncnacntaycarggncnt
 ggwsnwsntggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcntggathwsnytnngtnacngcnytncaaytngtn
 ytnngnytnwsngcngtntngnytnytnytnytnmngntggcarttyccngcncaytaymgnmngnytnmgncaycnyntg
 gccnwsnytnccngaytncaymngntnytnngncartaytngngayacngcngcnytnwsnccnccnaargcnacngtn
 wsnngayacntgygargargtngarccnwsnytnytnngarathytncnaarwsnwsngarmgnacnccnytnccnytnngywsn
 wsnargcncaratggaytaymgnmngnytnarccnwsntgytnggnacnatgccnytnwsngtntgyccnccnatggcngar
 wsnngnwsntgytgyacnacncayathgcnaycaywsntaytncnytnwsntaytggcarcarcentrrrr

SEQ ID No 2: TpoR.Δ60

580 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-580 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR с укорочением на C-конце.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFW
 DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
 LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPLG
 ARGGTLELRPRSRYLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
*VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPL*****

SEQ ID No 16: TpoR.Δ60

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgytntnytnngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygnwsnytnytnngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsnmgnacnttygargaytnacntgyttygggaygargarg
 argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygntayccnmngngaraarccnmngncntgyccnytnwsnwsncarwsn
 atgccncaytgygnacnmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtngnytnnttytyccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnnttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn

atgggnggnwsncarcncngngarytnncarathwsntgggargarccngcncncngarathwsngayttytntmgntaygarytnm
 gntayggncnmgngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngcncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygcncarcncacnatgccntggcargayggncncnaarcaracnw
 snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnarcncngnaaywsntaytg
 gytncarytnmgntnwsngarccngayggcnathwsnytnngngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
 ccngngaygcngtngcnytnngnytnartgyttyacnytngayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaycgn
 wsnwsncargnttytntaycaywsnmngcncmgntgytgyccnmngaymgntayccnathtgggaraaytgygargarga
 rgaraaracnaayccnggnytnarcacncncarttywsnmngntgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
 gtnargtnacnacngcncngnacngtnacaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
 cnaayytncaytggmngarathwsnwsnggncayytngarytnartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
 gytaycarytnmgntayacngngarggncaycargaytggaaargtnytnarcncncnytnngngcncmngngngnacnytn
 arytnmgncnmgntaymgnytnarytnmgngcncmgnytnaayggncnacntaycargncntggwsnwsn
 tggwsngayccnacmgntngaracngcncngaracngcngntggathwsnytnacngcnytncaayytnngnytnngnytn
 wsnngcngntnytnngnytnnytnnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgntmgnytnmgncaycnytnngccnwsnytn
 nccngayytncaymngntnytnngncartayytnmgngayacngcncnytnwsncncncnaargcncngtnwsngayacnt
 gygargargtnarcncnwsnytnnytngarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytntrrrr

SEQ ID No 3: TpoR.TpoR-cyt.IL2rβ-cyt

626 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-538 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR с укорочением на C-конце, 539-626 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен IL2rβ.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFW
 DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
 LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARC CPRDRYPIWE
 NCEEEKTPGLQTPQFSRCHFCSRNDSSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPPPLG
 ARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
 HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVPRDWDPPQLGPPTPGVP
 DLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSL
 QELQGQDPHTLV****

SEQ ID No 17: TpoR.TpoR-cyt.IL2rβ-cyt

atgccnwsntgggcnyntnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsnmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngaraarccnmngcngcngcnytnwsnwsncarwsn
atgccncaytyggnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnynttytyccnytncaaytntgggtnaaraa
ygtnttyytnaaycaracnmgnacncarmgngtnytnyngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaargcn
atgggnggnwsncarccngngarytnncarathwsntgggargargcngcncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
rmgncncaywsngcnwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacatgccntggcargayggncnaarcaracnw
snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnccarccnggnaaywsntaytg
gytnarytnmgntaycngcngayggcnathwsnytnnggngnwsntgggngnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
ccngngaycngtngcnytnngnytncartgyttyacnytnayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaycgn
wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngcnmgntgytgyccnmngaymgntayccnathgggaraaytyygargarga
rgaraaracnaayccngnytnccaracncncarttywsnmgtgycaytyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
gtngargtnacnacngcncngnacngtncaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
cnaaytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggcngcncargaracnt
gytaycarytnmgntaycngngarggncaycargaytggaaargtnytngarccncnytnngngcnmgngnggnacnytn
arytnmgncnmgnwsnmgtaymgnytnarytnmgncnmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
tggwsngayccnacnmngtngaracngcnacngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytncaaytnngnytnngnytn
wsngcngtnynggnytnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgnmgnytnmgncaycnytnngccnwsnytn
nccngayytncaymngtncnmngaytgggayccncarccnytnngncncnacncnggngtncngayytnngtngaytt
ycarccncncngarytnngnytnmgngargcngngargargtnccngaycnggncnmngarggngtnwsnttyccntg
gwsnmgncncncngncarggngarttymgngcnytnaaycngnytnccnytnaayacngaycnytnytnwsnytnncar
garytnccarggncargayccnacncayytnngtnrrrr

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

808 аминокислот представлены в направлении от N- к С-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-709 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен IL2rB, 710-808 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, укороченный с N-конца.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
PKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE**

NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFksrNDSIIHILVEVTTAPGTVHsYLGSPFWIHQAV
RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPLG
ARGGTLELRPRsRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLNCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPF
 PSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLP
 DALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLLF
 SPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVEPS
LLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGSCCTTHIANHSY
LPLSYWQQP**

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

atgccnwsntgggcnynnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
 argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngcngcnytnwsnwsncarwsn
 atgccncayttyggnacnmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmngnytnnttytccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnnttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
 atgggnggnwsncarccngngarytnncarathwsntgggargargcngcncncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmgngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngcncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygencarcncacnatgccntggcargayggncnnaarcaracnw
 snccnwsnmngngargcnwsngcnytnacngcngargggnggnwsntgyytnathwsnggnytnccarccnggnaaywsntaytg
 gytncarytnmgngnwsngarccngayggngathwsnytnnggnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
 ccngngaygcngtngcnytnnggnytncartgyttyacnytngayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaycgn
 wsnwsncarggnttytatyaywsnmngcncmgntgytgyccnmngngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
 rgaraaracnaayccnggnytnccaracncncarttywsnmngntgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
 gtnargtnacnacngcncnggnacngtncaaywsntayytnnggnwsncnttytgathcaycargcngtnmngnytnccnacnc
 cnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggngcncncargaracnt
 gytaycarytnmgntayacngngarggncaycargaytggaaargtnyngarccncnytnnggngcnmgngnggnacnytn
 arytnmgncnmgngnwsnmngntaymgnytnarytnmgngcnmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
 tggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytncaaytngtnynggnytn
 wsngcngtnynggnytnytnytnytnaaytgymgnaayacnggncntggynaraargtnytnaartgyaayacncngaycc
 nwsnaarttytywsncarytnwsnwsngarcayggngngaygtncaraartggytnwsnwsncnttyccnwsnwsnwsntt
 ywsncnggnggnytnngcncngarathwsncnytnargtnytnngarmngngayaargtnacncarytnytnytnccarargay
 aargtnccngarccngcnwsnytnwsnwsnaaycaywsnytnacnwsntgyttyacnaaycarggntayttyttytcaaytncc
 ngaycnytngarathgargcngtgycargntayttyacntaygayccntaywsngargargayccngaygargngtngcngngg
 cncnacnggnwsnwsncncarcnytnccarccnytnwsngngargaygaycngtgyacnttyccnwsnmngngaygay
 ytnytnytnnttywsncnwsnytnytnnggnggncnwsncncncnwsnacngcncnggnggnwsnggngcnggngargarg

mgnatgccnccnwsnytnccargarmgngntnynggncartayytnmgngayacngcngcnytnwsncnccnaargcnacngt
 nwsngayacntgygargargtngarcnwsnytnytngarathytncnnaarwsnwsngarmgnacnccnytnccnytnntygys
 nwsncargncaratggaytaymgngnytnccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngtntgyccnccnatggcnga
 rwsnggnwsntgytgyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcargarcntrrr

SEQ ID No 5: TpoR.SLAM

710 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-710 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен SLAM.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFW
 DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
 LWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTPSPREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTVTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPEPLG
 ARGGTLELRPRSRYLQLRLARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDAALSPPKAT
VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYLPLSYWQQPRRRGKTNHYQTTVEKKSLTIYAQVQKPGPLQKKLDSFPA
 QDPCTTIYVAATEPVPEVSVQETNSITVYASVTLPE****

SEQ ID No 19: TpoR.SLAM

atgccnwsntgggcnynnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtwnsnytnytnngcnwsngaywsngarcnnytnaartgyttywsmgnacnttygargayytnacntgyttytgggargargarg
 argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmnggaraarccnmngcngntgyccnytnwsnwsncarwsn
 atgccncayttyggnacnmngntaygtntgycarttycngaycargargargtmgnytnnttytccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmgngntnytnyngaywsngtnggnytnccngcncnccnwsnathathargcn
 atggnggnwsncarccngngarytnccarathwsntgggargarcngcncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggnccnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngncncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygncarccnacnatgccntggcargayggncncaarcaracnw
 snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargnggnwsntgyytnathwsnggnytnccnggnaywsntaytg
 gytncarytnmgngarccngaygnathwsnytnngnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngntngayytn
 ccngngaygngntngcnytnngnytnccartgyttyacnytnngayytnaaraaytnacntgycartggcargarcargaycaygn
 wsnwsncargnttytayaaywsnmngcncmngntgytgyccnmngaymgntayccnathgggaraaytgygargarga

rgaraaracnaayccnggnytnacaracnccncarttywsnmgtgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
 gtngargtnacnacngcncnggnacngtncaywsntayytnggnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
 cnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggnacayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
 gytaycarytnmgntayacnggngarggnacaycargaytggaaargtntyngarccnccnytnngngcnmgngnggnacnytn
 arytnmgncnmgngnwsnmgtaymgnytnarytnmgngcnmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
 tggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcntggathwsnytnngnacngnytncaaytngnytnngnytn
 wsnngcngtntnyngnytnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgngnytnmgncaygcnytnngccnwsnytn
 nccngayytncaymgngtntnggncartaytnmgngayacngcngnytnwsnccnccnaargcnacngtnwsngayacnt
 gygargargtngarccnwsnytnytnngarathytnccnaarwsnwsngarmgnacnccnytnccnytnngywsnwsncargcnc
 aratggaytaymgngnytnarccnwsntgyytnggnacnatgccnytnwsngntgyccnccnatggcngarwsnggnwsnt
 gytgyacnacncayathgnaaycaywsntayytncnnytnwsntaytggcarcarccnmgnmgngngnaaracnaaycay
 taycaracnacngtngaraaraarwsnytnacnathtaygcncargtncaraarccnggncnnytncaraaraarytngaywsnttycc
 ngcncargayccntgyacnacnathtaygtngcngcnacngarccngtncngarwsngtncargaracnaaywsnathacngnt
 aygcnwsngtnacnytnccngarwsntrrrrr

SEQ ID No 6: TpoR.IL2ry

721 аминокислота представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-721 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен SLAM.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFW
 DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
 LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPPGLG
 ARGGTLELRPRSRYLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
 VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
 CCTTHIANHSYLPLSYWQQPERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
 PDYSERLCLVSEIPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET****

SEQ ID No 20: TpoR.IL2ry

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytntnytnngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnytnytnngcncnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsnmgnacnttygargayytncantgyttytgggaygargarg

argcngcncnwsnggnacntaycarytnyntaygcntayccnmngngaraarccnmngcngcntgyccnytnwsnwsncarwsn
atgccncayttyggnacnmgntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnyntnttytyccnytncayytntgggtnaaraa
ygtnttyytnaaycaracnmgnacncarmngntnyntnttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaargcn
atggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarcngcncncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
rmgncncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygcncarccnacnatgccntggcargayggncnaarcaracnw
snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaaywsntaytg
gytnarytnmgntaycngcngaygggnathwsnytnnggnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
ccngngaygcngtngcnytnngnytnartgytyacnytngayytnaaraaygtnacntgycartggcarcarcargaycaygn
wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngcncmgntgytgyccnmngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
rgaraaracnaayccnggnytnaracncncarttywsnmgntgycayytaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
gtngargtnacnacngcncngnacngtncaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
cnaayytncaytggmngarathwsnwsnggncayytngarytnartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
gytaycarytnmgntaycnggngarggncaycargaytggaargtnytnarccncnytnngngcncmngngngnacnytn
arytnmgncncnmgnwsnmgntaymgnytnarytnmgncncmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
tggsngayccnacnmngtngaracngcncngaracngcntggathwsnytnngtnacngcnytncayytnngnytnngnytn
wsngcngtntngnytnnytnnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgnmngnytnmgncaygcnytnntggccnwsnytn
nccngayytncaymngntnytnngncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccncncnaaracngntnwsngayacnt
gygargargtnarccnwsnytnnytnarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytnntgywsnwsncargcnc
aratggaytaymgnmngnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngtntgyccncncatggcngarwsnggnwsnt
gytgyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggarcarccngarmgnacnatgccnmgnathccnac
nytnaaraayytnargayytnngtnacngartaycayggnaaytywsngcngggngngtnwsnaarggnytnngcngarwsn
ytnarccngaytaywsngarmgnytnntgyytnngtnwsngarathccncncnaarggngngcnytnngngarggncnggngcn
wsncntgyaaycarcaywsncntaytggggncncncntgytayacrngaracntrntrnargng

SEQ ID No 7: TpoR-TLR1

817 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-817 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен SLAM.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
PKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE**

NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFksRNDsIIHILVEVTTAPGTVHsYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSswAAQETCYQLRYTGEGHQDWKvLEPPLG
 ARGGTLELRPRsRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAwISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
 VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
 CCTTHIANHSYLPLSYWQQPDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISY
 SGHDSFWVKNELLPNLEKEGMQICLHERNFVPGKSIVENIITCIEKSYKSIFVLSPNFVQSE
 WCHYELyFAHHNLFHEGSNSLILILLEPIpQYSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKR
 GLFWANLRAAINIKLTeQAKK**

SEQ ID No 21: TpoR-TLR1

atgccnwsntgggcnynnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
 argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngcngcnytnwsnwsncarwsn
 atgccncayttyggnacnmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnnttytccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnnttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
 atggnggnwsncarccngngarytnncarathwsntgggargargcngcncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngcncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygencarccnacntatgccntggcargayggncnnaarcaracnw
 snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnccarccnggnaaywsntaytg
 gytncarytnmgntnwsngarccngayggntathwsnytnngngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
 ccngngaygcngtngcnytnngnytncartgyttyacnytngayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaygcn
 wsnwsncargnttytatyaywsnmngcncmgntgytgyccnmngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
 rgaraaracnaayccngnytnccaracncncarttywsnmngntgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
 gtngargtnacnacngcncngnacngtncaaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
 cnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
 gytaycarytnmgntayacngngarggncaycargaytggagrtnytngarccncnytnngngcncnmngngngnacnytn
 arytnmgncnmgntnwsnmngntaymgnytnarytnmgncnmngnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
 tggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytncaaytngntnytnngnytn
 wsngcngtnytnngnytnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgntnytnmgncaygnytnntggccnwsnytn
 nccngayytncaymngntnytnngncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcnacngtnwsngayacnt
 gygargargtnarccnwsnytnytnngarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytnntgywsnwsncargcnc
 aratggaytaymgntnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngntgyccncnatggcngarwsnggnwsnt
 gytgyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcarcarccngayytnccntggtayytnmgntatggn
 tgycartggaacncaracnmngnmngnmngcncmngnaayathccnytnngarytnncarmgnaayytncarttycaygcnttyath
 wsntaywsngncaygaywsnttytggnnaaraaygarytnytnccnaayytngaraargarggnatgcarathgyytncaayar

mgnaaytygtncnggnaarwsnathgtngaraayathathacntgyathgaraarwsntayaarwsnathtygtnytnwsncn
 aaytygtncarwsngartggtycaytaygaryntaytygcncaycayaaytnttycaygarggnwsnaaywsnytnathytna
 thyntnyngarcnathccncartaywsnathccnwsnwsntaycayaarytnaarwsnytnatggcnmgmgnacntayytnga
 rtggccnaargaraarwsnaarmgngnynttytgggcnaaytnmgngcngcnathaaayatharytnacngarcargcnaara
 artrtrtr

SEQ ID No 8: TpoR-TIAF1

750 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-750 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен TIAF1.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFW
 DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
 LWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTPSPREASALTAEGGSC LISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSWLPVTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHF KSRNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPEPLG
 ARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTA
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYLPLSYWQQPMSSPSPFREQSFLCAAGDAGEESRVQVLKNEVRRGSPV
 LLGWVEQAYADKCVCGPSAPPAPT PPSLSQRVMCNDLFKVNPFQLQQFRADPSTASLLL
 CPGGLDHKLNLRGKAWG****

SEQ ID No 22: TpoR-TIAF1

atgccnwsntgggcnynttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarcnytnaartgyttywsnmgnacnttygargaytnacntgyttygggaygargarg
 argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngaraarccnmngcngcnytnwsnwsncarwsn
 atgccncaytyggnacnmntaygtntgycarttyccngaycargargargtmngnynttytyccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtngnytnccngcncncnwsnathathargcn
 atggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargarcngcncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmgngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytycngcnytnca
 rmngcncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygcncarccnacatgccntggcargayggncnnaarcaracnw
 snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngarggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaaywsntaytg
 gytncarytnmgngnwsngarcngayggnathwsnytnngnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtnayytn

ccngngaygcngtngcnytnngnytncartgytтыacnytnгаyynaaraaygtnacntgycartggcarcarcargaycaygcn
wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngncnmgntgytgyccnmngaymgntayccnathtgggaraaytygargarga
rgaraaracnaayccnggnytnacaracncncarttywsnmngntgycaytтыaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
gtngargtnacnacngcncnggnacngtncaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
cnaaytncaytggmgngarathwsnwsnggncaaytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggcngcncargaracnt
gytaycarytnmgntayacnggngarggncaycargaytggaaargtnytngarccncnytnngngcnmgngnggnacnytn
arytnmgncnmgntaymgntaymgnytnarytnmgngcnmgnytnaayggncnacntaycarggnccntggwsnwsn
tggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcntggathwsnytnngnacngcnytncaaytnngnytnngnytn
wsngcngtnytnngnytnnytnnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgnmngnytnmgncaygcnnytnngccnwsnytn
nccngaytncaymngntnytnngncartaytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcnacngtnwsngayacnt
gygargargtngarccnwsnytnnytngarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytnngywsnwsncargcnc
aratggaytaymgnmngnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngntngyccncnatggcngarwsnggnwsnt
gytgyacnacncayathgcnaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcarcarccnatgwsnwsnccnwsnwsncnttytn
ngarcarwsnttytnngygcngcnggngaygcnggngargarwsnmngntncargtnytnaaraaygargtnmgnmngngn
wsnccngtnytnngntgggtngarcargcntaygcngayaartgygntngyggncnwsngcncncngcncncnacncnc
cnwsnytnwsncarmngntnatgtgyaaygayytnntyaargtnaayccnttycarytnarccarttymgngcngayccnwsnacn
gcnwsnytnnytnngyccnggngnytnгаycaarytnaaytnmgnggnaargcntggggntrrrr

SEQ ID No 9: TpoR-CD40

697 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-697 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен CD40.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTEFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
PKQTPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPPPLG
ARGGTLELRPRSRYLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYLPLSYWQQPKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQET
LHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ****

SEQ ID No 23: TpoR-CD40

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsnmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngtyccnytnwsnwsncarwsn
atgccncayttyggcnacnmgtaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnynttytyccnytncaaytntgggtnaaraa
ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaargcn
atgggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargargcngcncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytyccngcnytnca
rmgncncaywsngcnwsngcnytnaycarwsncntgygcncarccnacnatgccntggcargayggncncaarcaracnw
snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaaywsntaytg
gytnarytnmgntnwsngarccngaygggnathwsnytnnggnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngaytn
ccngngaygcngtngcnytnnggnytnartgyttyacnytnayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaygn
wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngcncmgntgytyccnmngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
rgaraaracnaaycnggnytnaracncncarttywsnmgtgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
gtngargtnacnacngcncnggnacngtnacaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
cnaaytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytngarytnartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
gytaycarytnmgntayacnggngarggncaycargaytgaargtnytnarccncnytnnggngcncmgngnggnacnytn
arytnmgncncnmgnwsnmgtaymgnytnarytnmgncncmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
tggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcngtggathwsnytnngnacngcnytncaaytnngnytnnggnytn
wsngcngtntnggnytnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgnmngnytnmgncaycnytnngccnwsnytn
nccngayytncaymngntnytnngncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcnacngtnwsngayacnt
gygargargtnarccnwsnytnytnarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytnngywsnwsncargcnc
aratggaytaymgnmngnytnarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngtntgyccncnatggcngarwsnggnwsnt
gytgyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcarcarccnaaraargtngcnaaraarccnacnaaya
argcncncayccnaarcarcargarccncargarathaaytyccngaygayytnccnggnwsnaayacngcngcncngtncargara
cnytncaayggntgycarcngtnacncargargayggnaargarwsnmgnathwsngtncargarmgncartrrtr

SEQ ID No 10: TpoR-ITAM1

676 аминокислот представлены в направлении от N- к С-концу, из которых 1-491 (жирный): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-676 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен ITAM1.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG**

PKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPLEPLG
 ARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHAWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
 VSDTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
 CCTTHIANHSYLPLSYWQQPRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
 RGR**

SEQ ID No 24: TpoR-ITAM1

atgccnwsntgggcnynnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
 argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngtgyccnytnwsnwsncarwsn
 atgccncayttyggnacnmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnytnnttytccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnyngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
 atggnggnwsncarccngngarytnncarathwsntgggargargcngcncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmgngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngcncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygencarccnacntatgccntggcargayggncnnaarcaracnw
 snccnwsnmngngargcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnccarccnggnaaywsntaytg
 gytncarytnmgngnwsngarccngayggcnathwsnytnngngnwsntggngnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
 ccngngaygcngtngcnytnngnytncartgyttyacnytnngayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaycgn
 wsnwsncargnttytatyaywsnmngcncmgntgytgyccnmngngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
 rgaraaracnaaycnggnytnccaracncncarttywsnmngntgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
 gtnargtnacnacngcncnggnacngtncaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
 cnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytnngarytnngartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
 gytaycarytnmgntayacngngarggncaycargaytggagrtnytnngarccncnytnngngcncnmngnggnacnytn
 arytnmgncnmgngnwsnmngntaymgnytnarytnmgngcncmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
 tggwsngayccnacnmngntngaracngcncngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytncaaytngtnynggnytn
 wsngcngtnynggnytnytnytnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgngnytnmgncaycnytnngccnwsnytn
 nccngayytncaymngntnytnngncartayytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcnacngtnwsngayacnt
 gygargargtnarccnwsnytnytnngarathytnccnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytnngywsnwsncargcnc
 aratggaytaymgngnytnccarccnwsntgyytnngnacnatgccnytnwsngntgyccncnatggcngarwsnggnwsnt
 gytgyacnacncayathgcnaaycaywsntayytnccnytnwsntaytggcarcarccnmngntnaarttywsnmngnwsngcng
 aygncncngcnytnaycarcarggncaraaycarytnayaaygarytnaayytnngngnmngngargartaygaygtnytnngayaar
 mgngngngnmgntrrrr

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

836 аминокислот представлены в направлении от N- к С-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-635 (жирный шрифт, курсив): цитоплазматический домен TpoR, 636-836 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен LMP-1.

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
PKQTPSPREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPPGLG
ARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKAT
*VS*DTCEEVEPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGS
CCTTHIANHSYLPLSYWQQPYHGQRHSDEHHHDDSLPHPQQATDDSGHESDSNSNEGR
HHLLVSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQ
DPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEVENKGGDQGPPLM
TDGGGGHSHDSGHGGGDPHLPTLLLGS SGGDDDDPHGPVQLSYYD****

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

atgccnwsntgggcnynnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
ygnwsnytnyngcnwsngaywsngarcnynartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
argcncncnwsngnacntaycarytnyntyaycncnmngnaraarccnmngcngcngcnytnwsnwsncarwsn
atgccncaytyggnacnmngntaygtntgycarttycngaycargargargtnmgnynttytyccnytncayytntgggtnaaraa
ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
atggnggnwsncarcngngarytnncarathwsntgggargarcngcncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
gntayggncnmngaycnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
rmgncncaywsngcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnarcnggnaaywsntaytg
gytnarytnmgcnwsngarcngayggnathwsnytnngnggnwsntgggggnwsntggwsnytnccngtnacngtnayytn
ccngngaycngtngcnytnngnytnartgyttyacnytnayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaycnc
wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngcncmgntgytgyccnmngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
rgaraaracnaaycnggnytnarcacncncarttywsnmngntgycaytyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
gtngargtnacnacngcncngnacngtnacaywsntayytnngnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc

cnaaytncaytggmgngarathwsnwsnggncaaytngarytngartggcarcayccnwsnwsntggcngcncargaracnt
 gytaycarytnmgntayacnggngarggncaycargaytggagrtnyngarccncnytnngngcnmgngnggnacnytn
 arytngnccnmgnwsnmgntaymgnytnarytnmgngcnmgnytnaayggncnacntaycarggnccntggwsnwsn
 tggwsngayccnacmgngtngaracngcnacngaracngcntggathwsnytnngnacngcnytncaaytngnytnngnytn
 wsngcngtntngnytnnytnnytnmgntggcarttyccngcncaytaymgngnytnmgncaygcnnytnngccnwsnytn
 nccngaytncaymgngtntnggncartaytnmgngayacngcngcnytnwsnccncnaargcnacngtwsngayacnt
 gygargartngarccnwsnytnnytnngarathytncnaarwsnwsngarmgnacncnytnccnytnngywsnwsncargcnc
 aratggaytaymgngnytnarccnwsntgyytnggnacnatgccnytnwsngntgyccncnatggcngarwsnggnwsnt
 gytgyacnacncayathgcnaycaywsntaytncnytnwsntaytggcarcarccntaycayggncarmgncaysngayg
 arcaycaycaygaywsnytnccncayccncarcargcnacngaygaywsnggncaycgarwsngaywsnaaywsnaayga
 rggmgncaycaytntngtwsnggngcnggngayggncncnytnngywsncaraaytnggngcncnggnggnggn
 ccngayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncna
 ygayccnytnccncargayccngayaayacngaygayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncayg
 ayccnytnccncaywsnccnwsngaywsngcnggnaaygayggnggncncncarytnacngargartngaraayaarggn
 ggngaycarggncncnytnatgacngayggnggnggngncaywsncaygaywsnggncayggnggnggngayccncay
 ytnccnacnytnnytnnggnwsnwsnggnwsnggnggngaygaygayccncayggncngtncarytnwsntaytayga
 ytrtrr

SEQ ID No 12: TpoR.LMP1-cyt

714 аминокислот представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-714 (неформатированный шрифт): LMP-1 цитоплазматический домен.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSTRFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
LWVKNVFLNQTRTRQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
PKQTPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARC CPRDRYPIWE
NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RND SIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLEPLG
ARGGTLELRPRSRYLQLRRLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLYHGQRHSDEHHHDDSLPHPQQATDDSGHESDSNSNEGRHLL
VSGAGDGPPLCSQNLGAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQDPDN
TDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEVENKGGDQGPPLMTDGG
GGHSHDSGHGGGDPHLPTLLLGS SGGDDDDPHGPVQLSYYD**

SEQ ID No 26: TpoR.LMP1-cyt

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsnmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
argcngcncnwsnggnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngtgyccnytnwsnwsncarwsn
atgccncayttyggnacnmgntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnynttytyccnytncaaytntgggtnaaraa
ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathaargcn
atgggnggnwsncarccngngarytnarathwsntgggargargcngcncngarathwsngaytyytnmgntaygarytnm
gntayggncnmngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
rmgncncaywsngcnwsngcnytnacngcngargggnggnwsntgyytnathwsnggnytnarccnggnaaywsntaytg
gytnarytnmgntnwsngarccngaygggnathwsnytnnggnggnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
ccngngaygcngtngcnytnnggnytnartgyttyacnytnayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaygc
wsnwsncarggnttytytaycaywsnmngcncmgntgytgyccnmngaymgntayccnathtgggaraaytygargarga
rgaraaracnaaycnggnytnaracncncarttywsnmgntgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
gtngargtnacnacngcncnggnacngtncaywsntayytnnggnwsncnttytgathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
cnaaytncaytggmngarathwsnwsnggncayytngarytngartggcarcayccnwsnwsntgggcngcncargaracnt
gytaycarytnmgntayacnggngarggncaycargaytgaargtnytnarccncnytnnggngcncmgngnggnacnytn
arytnmgncncnmgnwsnmgntaymgnytnarytnmgncncmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
tggwsngayccnacnmngntngaracngcncngaracngcngtggathwsnytnngnacngcnytncaaytngnytnnggnytn
wsngcngtnytnngnytnytnytnytnaycayggncarmgncaywsngaygarcaycaycaygaygaywsnytnccncaycc
ncarcargcncngaygaywsnggncaygarwsngaywsnaaywsnaaygarggngmncaycayytnytnngtnwsnggngc
nggn

gayggncncncnytnntywsncaraaaytnggngcncncnggnggnggncngayaayggncncargayccngaya
ayacngaygayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncaygayccnytnccncargayccngayaay
acngaygayaayggncncargayccngayaayacngaygayaayggncncaygayccnytnccncaywsnccnwsngay
wsngcnggnaaygayggnggncncncarytnacngargargtngaraayaarggngngaycarggncncncnytnatgacn
gayggnggnggnggncaywsncaygaywsnggncayggnggnggngayccncayytnccnacnytnytnytnnggnwsnws
nggnwsnggnggngaygaygaygayccncayggncngtncarytnwsntaytaygaytrtrtr

SEQ ID No 13: TpoRec.TpoRtm.CD137cyto

555 аминокислот представлены в направлении от N- к С-концу, из которых 1-491 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт): домен TM из TpoR, 514-555 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен CD137 .

**MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFW
DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH**

LWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTSPREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGSWSLPVTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKS RNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPLG
 ARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL**

SEQ ID No 27: TpoRec.TpoRtm.CD137cyto

atgccnwsntgggcnynnttyatggtnacnwsntgyytnyntyngcncncaraaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnyntyngcncnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttygggargarg
 argcncncnwsngnacntaycarytnyntyngcncnwsngarccnmgngaraarccnmgngcngcnytnwsnwsncarwsn
 atgccncayttyggnacmngntaygtntgycarttyccngaycargargargtnmgnynttytccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnynttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
 atggngnwsncarccngngarytnncarathwsntgggargargcncncncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmgngayccnaaraaywsnacngncncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngcncaywsngcncnwsngcnytngaycarwsncntgygcncarccnacatgccntggcargayggncncnaarcaracnw
 snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnccarccngnaaywsntaytg
 gytncarytnmgngnwsngarccngayggcnathwsnytnngngnwsntggggnwsntggwsnytnccngtnacngtngaytn
 ccngngaygcngtngcnytnngnytnartgyttnaytnaytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaygn
 wsnwsncargnttytlaycaywsnmngcncmngntgytgyccnmngaymgntayccnathgggaraayt
 gygargargaraaracnaayccngnytnccaracncncarttywsnmngntgycayttnaaywsnathat
 hcayathytngtngargtnacnacngcncngnacngtncaaywsntaytnngnwsncnttyggathcaycargcngtnmgn
 ytnccnacncnaaytncaytggmgngarathwsnwsngncaytngarytnartggcarcayccnwsnwsntgggcngcn
 cargaracntgytacytnmgntayacngngarggncaycargaytggargnytnarccncnytnngngcnmgngng
 gnacnytnarytnmgncnmgntaymgnytnarytnmgncnmngnytnaayggncnacntaycarggncnt
 ggwsnwsntggwsngayccnacmngntngaracngcncngaracngcnggathwsnytnngtnacngcnytncaaytngn
 ytnngnytnwsngcngtntngnytnytnytnaarmngngnmgnaaraarytnytnayathhtyaarccnttyatgmgn
 ccngtnaracnacncargargargayggntgywsntgymgnttyccngargargargggngntgygarytntrtrr

SEQ ID No 14: TpoRec.TpoRtm.CD28cyto

554 аминокислоты представлены в направлении от N- к C-концу, из которых 1-491
 (жирный шрифт): внеклеточный домен TpoR, 492-513 (жирный, подчеркнутый шрифт):
 домен TM из TpoR, 514-554 (неформатированный шрифт): цитоплазматический домен
 CD28.

MPSWALFMVTSCLLLAPQNLAQVSSQDVSLASDSEPLKCFSRTFEDLTCFW

DEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLH
 LWVKNVFLNQTRTQRVLFVDSVGLPAPPSIIKAMGGSQPGELQISWEEPAPEISDFL
 RYELRYGPRDPKNSTGPTVIQLIATETCCPALQRPHSASALDQSPCAQPTMPWQDG
 PKQTSPSREASALTAEGGSCLISGLQPGNSYWLQLRSEPDGISLGGSWGWSLPTV
 DLPGDAVALGLQCFTLDLKNVTCQWQQQDHASSQGFFYHSRARCCPRDRYPIWE
 NCEEEKTNPGLQTPQFSRCHFKSRNDSIIHILVEVTTAPGTVHSYLGSPFWIHQAV
 RLPTPNLHWREISSGHLELEWQHPSWAAQETCYQLRYTGEGHQDWKVLPLEPLG
 ARGGTLELRPRSRYRLQLRARLNGPTYQGPWSSWSDPTRVETATETAWISLVTAL
HLVLGLSAVLGLLLLRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS**

SEQ ID No 28: TpoRec.TpoRtm.CD28cyto

atgccnwsntgggcnynnttyatggnacnwsntgyytnytnyngcncncaraaaytngcncargtnwsnwsncarga
 ygtnwsnytnyngcnwsngaywsngarccnytnaartgyttywsmgnacnttygargaytnacntgyttytgggaygargarg
 argcngcncnwsngnacntaycarytnytnaygcntayccnmngnaraarccnmngcngtgyccnytnwsnwsncarwsn
 atgccncayttyggnacnmngntaygntgycarttycngaycargargargtnmgnytnnttytccnytncaaytntgggtnaaraa
 ygtnttytnaaycaracnmgnacncarmngntnytnnttygtngaywsngtnggnytnccngcncncnwsnathathargcn
 atggnggnwsncarccngngarytnncarathwsntgggargargcngcncngarathwsngayttytnmgntaygarytnm
 gntayggncnmgngayccnaaraaywsnacnggncnacngtnathcarytnathgcnacngaracntgytgyccngcnytnca
 rmngcncaywsngcnwsngcnytngaycarwsncntgygencarcncacnatgccntggcargayggncnnaarcaracnw
 snccnwsnmngargcnwsngcnytnacngcngargggngnwsntgyytnathwsnggnytnccarccnggnaaywsntaytg
 gytncarytnmgngnwsngarccngayggcnathwsnytnngngnwsntggngnwsntggwsnytnccngtnacngtngayytn
 ccngngaygcngtngcnytnngnytncartgyttyacnytnngayytnaaraaytnacntgycartggcarcarcargaycaygn
 wsnwsncargnttytitycaywsnmngncnmngntgytgyccnmngngaymgntayccnathgggaraaytygargarga
 rgaraaracnaaycnggnytnccaracncncarttywsnmngntgycayttyaarwsnmgnaaygaywsnathathcayathytn
 gtnargtnacnacngcncngnacngtncaywsntayytnngnwsnccnttyggathcaycargcngtnmgnytnccnacnc
 cnaayytncaytggmgngarathwsnwsnggncayytnngarytnngartggcarcayccnwsnwsntgggngcncargaracnt
 gytaycarytnmgntaycngngarggncaycargaytggaaargtnytnngarccncnytnngngcnmgngnggnacnytn
 arytnmgncnmgngnwsnmngntaymgnytnarytnmgngcnmgnytnaayggncnacntaycarggncntggwsnwsn
 tggwsngayccnacnmngntngaracngcnacngaracngcngtggathwsnytnngtnacngcnytncaaytngnytnngnytn
 wsngcngtngnytnngnytnytnytnytnmgngnwsnaarmngnwsnmngnytnytncaaywsngaytaytgaytgacncnmgngn
 mgncnggncnacnmgnaarcataycarcncntaygcncncnmgngaytgygngcngntaymgngnwsntrrrr

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Т-или НК-клетка, содержащая химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR), включающий:

- (i) внеклеточный (ЕС) домен;
- (ii) трансмембранный (ТМ) домен тромбopoэтина; и
- (iii) первый внутриклеточный (IC) домен; и, необязательно,
- (iv) второй внутриклеточный домен.

2. Т-или НК-клетка по п. 1, отличающаяся тем, что связывание лиганда с CrGFR индуцирует пролиферацию Т- или НК-клетки.

3. Т-или НК-клетка по п. 2, отличающаяся тем, что лиганд представляет собой тромбopoэтин человека, агонист рецептора тромбopoэтина или антиген, ассоциированный с опухолью.

4. Т-или НК-клетка по п. 3, отличающаяся тем, что агонист рецептора тромбopoэтина связывается с доменом ТМ.

5. Т-или НК-клетка по п. 3 или 4, отличающаяся тем, что агонист рецептора тромбopoэтина выбран из Элтромбопага и Ромиплостима.

6. Т-или НК-клетка по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что домен ЕС включает домен ЕС из c-mpl (тромбopoэтина) человека.

7. Т-или НК-клетка по пп. 1-5, отличающаяся тем, что домен ЕС включает один или несколько из числа i) укороченного домена ЕС, ii) укороченного домена ЕС из c-mpl, iii) домена, который связывается с антигеном, ассоциированным с опухолью, iv) антитела или фрагмента антитела, которые связываются с антигеном, ассоциированным с опухолью; и v) селекционного маркера.

8. Т-или НК-клетка по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что первый домен IC выбран из рецептора гормона роста человека, рецептора пролактина человека, рецептора тромбopoэтина человека (c-mpl), рецептора G-CSF, рецептора GM-CSF, LMP, IL2, CD28 или CD137.

9. Т-или НК-клетка по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что первый домен IC включает домен IC из рецептора тромбopoэтина человека (c-mpl) или укороченный домен IC из рецептора тромбopoэтина человека (c-mpl).

10. Т- или НК-клетка по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что второй домен IC происходит из рецептора гормона роста человека, рецептора пролактина человека, рецептора тромбopoэтина человека (c-mpl), рецептора G-CSF или рецептора GM-CSF, костимулирующего рецептора, рецептор цитокина или рецептора

косигнализации.

11. Т-или НК-клетка по п. 8 или п. 9, отличающаяся тем, что второй домен IC выбран из рецептора тромбопоэтина человека (с-mpl) или укороченного домена IC из рецептора тромбопоэтина человека (с-mpl), предпочтительно ТроR Δ60, CD40, IL2rβ, IL2Rγ, ITAM1 или LMP1.

12. Т-или НК-клетка по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что CrGFR содержит последовательность TM, показанную в SEQ ID No 1, или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80%, которые связывают тромбопоэтин человека или агонист рецептора тромбопоэтина.

13. Т-или НК-клетка, содержащая химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR), где CrGFR включает последовательность, показанную как SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 или ее вариант, идентичный по последовательности по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99%, которые связывают тромбопоэтин человека или агонист рецептора тромбопоэтина.

14. Т-или НК-клетка по п. 13, отличающаяся тем, что связывание тромбопоэтином или агонистом рецептора тромбопоэтина человека индуцирует пролиферацию и/или выживание клеток.

15. Т-клетка или НК-клетка по любому из предшествующих пп., которая связывается с Элтромбопагом.

16. Т-клетка или НК-клетка по любому из предшествующих пп., отличающаяся тем, что Т-клетка выбрана из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), регуляторных Т-клеток (Treg) или первичных Т-клеток.

17. Т-клетка или НК-клетка по любому из предшествующих пп., дополнительно содержащая рекомбинантный Т-клеточный рецептор (TCR) и/или химерный антигенный рецептор (CAR).

18. Химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR), определенный в любом из предшествующих пп.

19. Клетка, содержащая химерный рекомбинантный рецептор фактора роста (CrGFR) по п. 18.

20. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CrGFR по любому из предшествующих пп.

21. Последовательность нуклеиновой кислоты по п. 20, которая содержит последовательность, показанную как SEQ ID No 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28.

22. Вектор, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты по п. 20

или 21.

23. Способ получения Т-клетки или НК-клетки по любому из пп. 1-17, который включает стадию введения нуклеиновой кислоты по п. 20 или 21 или вектора по п. 22 в Т-клетку или НК-клетку.

24. Фармацевтическая композиция, которая включает вектор по п. 22 или Т- или НК-клетку по пп. 1-17 вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или эксцепиентом.

25. Способ размножения клеток *in vivo*, включающий введение объекту клеток по пп. 1-17 или фармацевтической композиции по п. 24.

26. Способ размножения клеток *in vivo* по п. 25, включающий введение объекту тромбозтина или агониста рецептора тромбозтина, такого как Элтромбопаг или Ромиплостим.

27. Т-или НК-клетка по любому из пп. 1-17 или вектор по п. 22 для применения в адоптивной клеточной терапии.

28. Т-или НК-клетка по любому из пп. 1-17 или вектор по п. 22 для применения в способе лечения онкологических заболеваний.

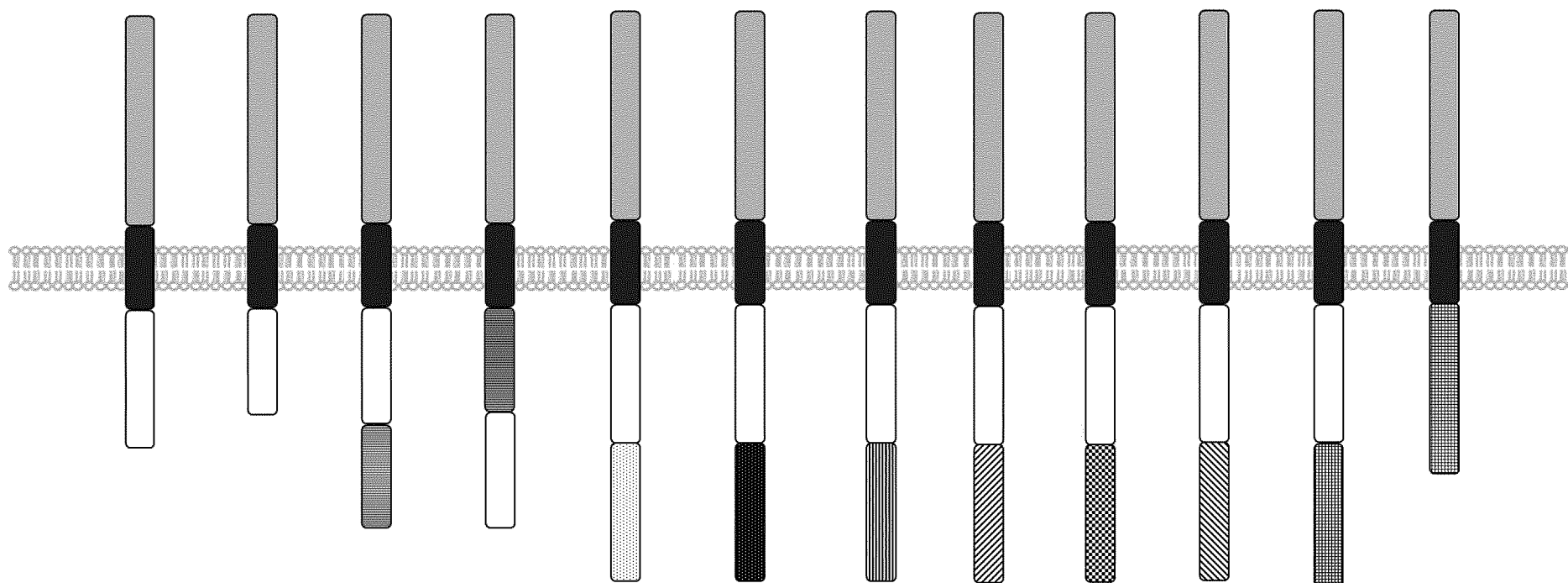
29. Способ лечения онкологических заболеваний, который включает стадию введения объекту Т-клетки или НК-клетки по любому из пп. 1-17.

30. Применение вектора по п. 22 или Т-или НК-клетки по любому из пп. 1-17 при изготовлении лекарственного средства для лечения онкологических заболеваний.

31. Элтромбопаг для применения при размножении *in vitro* или *in vivo* Т-или НК-клеток по любому из пп. 1-17.

32. Композиция, содержащая Т-или НК-клетку по пп. 1-17, для применения в комбинации с тромбозтином или агонистом рецептора тромбозтина при лечении онкологических заболеваний.

Фиг. 1



ТроR
дикого типа

ТроR Δ60

ТроR. cyt.
IL2rβ-
cyt

ТроR- cyt.
IL2rβ-
cyt

ТроR. IL2rβ-
cyt. ТроR-
cyt

ТроR. SLAM

ТроR. TIAF1

ТроR.
TLR1

ТроR. CD40

ТроR.
IL2rγ

ТроR.
ITAM1

ТроR.
ТроR-cyt.
LMP1

ТроR.
LMP1

Внеклеточный домен ТроR

Цитоплазматический домен ТроR

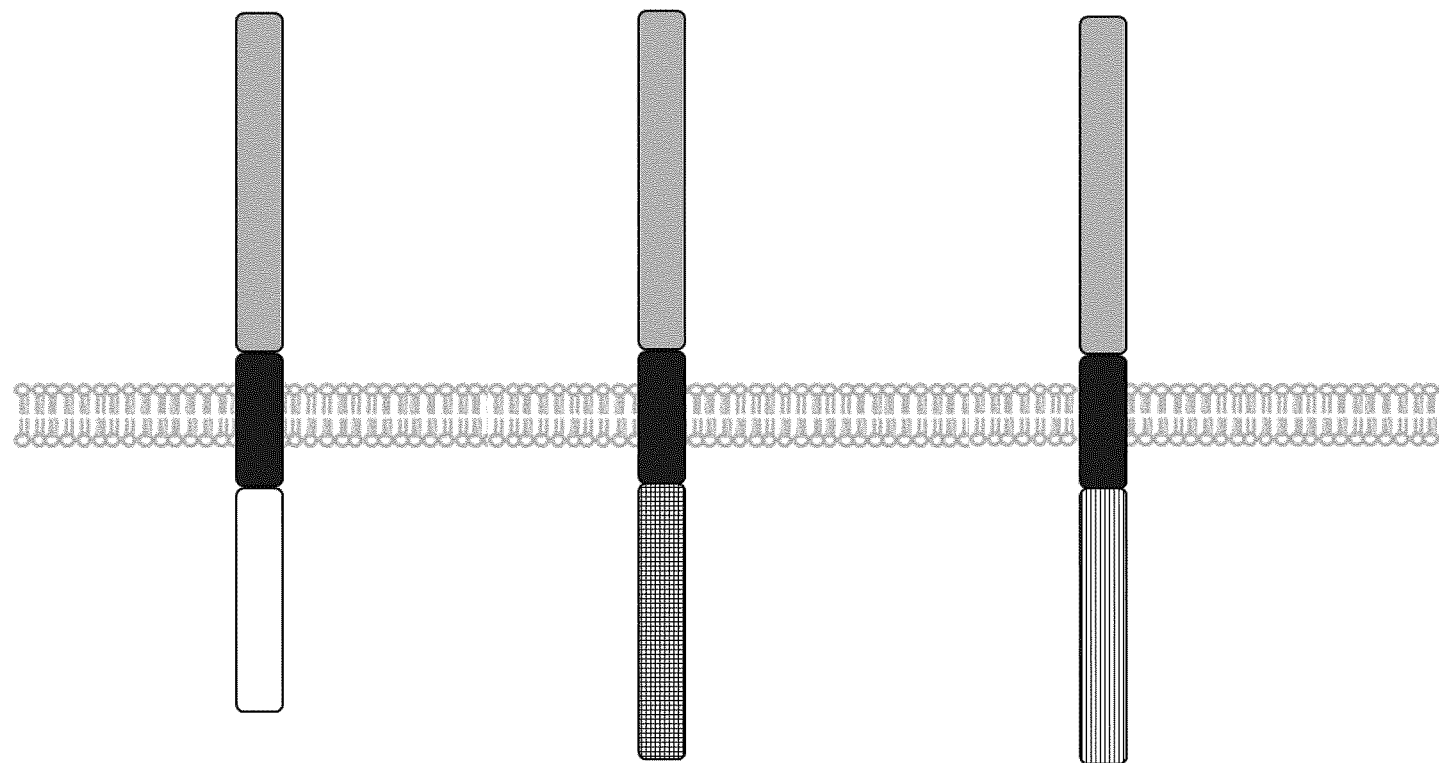
Плазматическая мембрана

Трансмембранный домен ТроR



Дополнительный фактор роста, домен косигнализации или домен костимуляции цитоплазматический домен

Фиг. 2



■ Внеклеточный домен TcrR
■ Трансмембранный домен TcrR

□ Цитоплазматический домен TcrR
⊞ Плазматическая мембрана

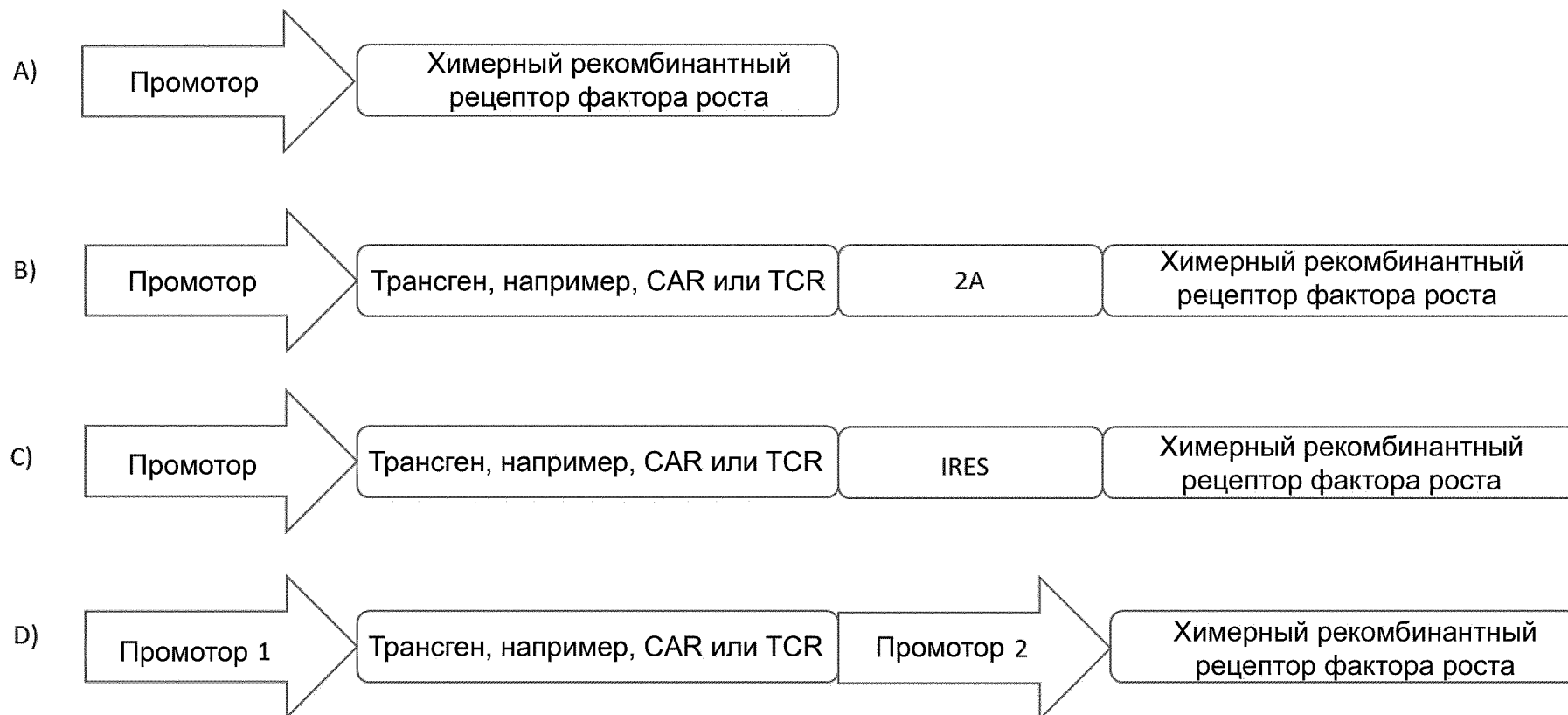
TcrR
дикого типа

TcrRec.
TcrRtm
CD28cyto

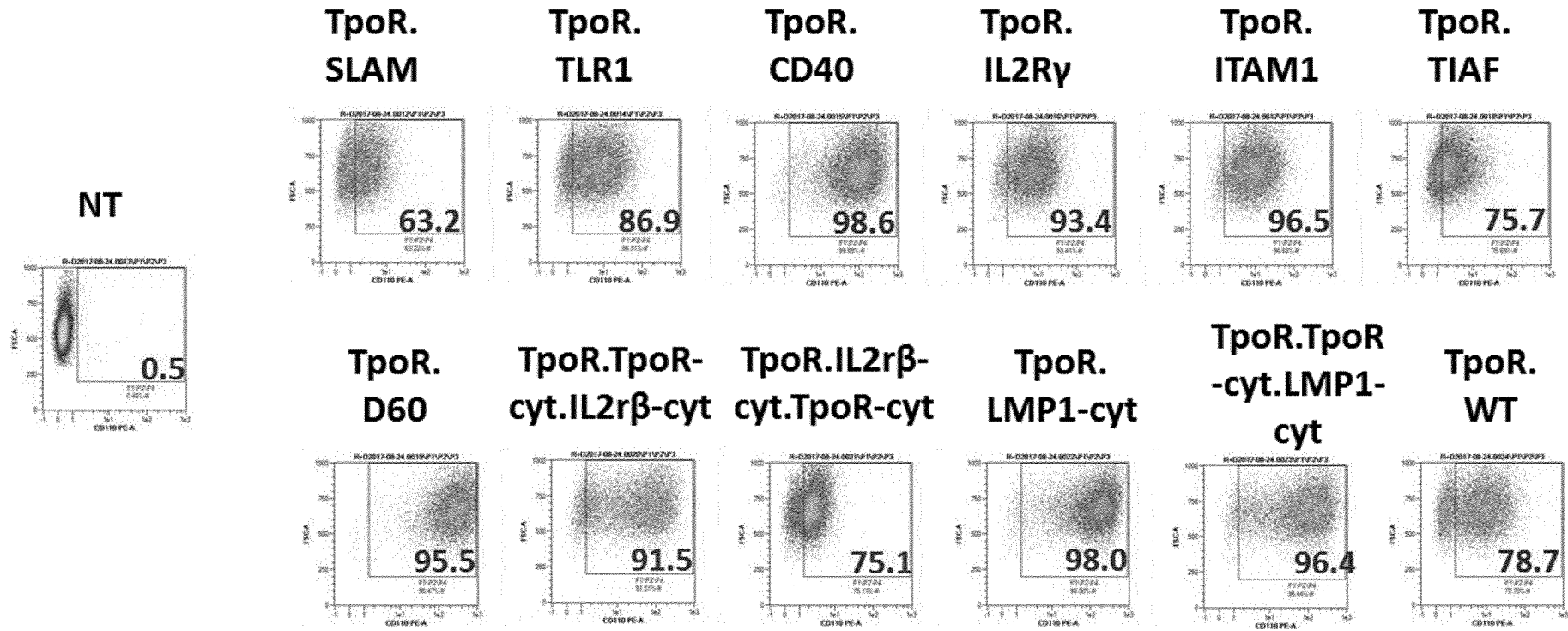
TcrRec.
TcrRtm
CD137cyto

▨ Костимулирующий домен

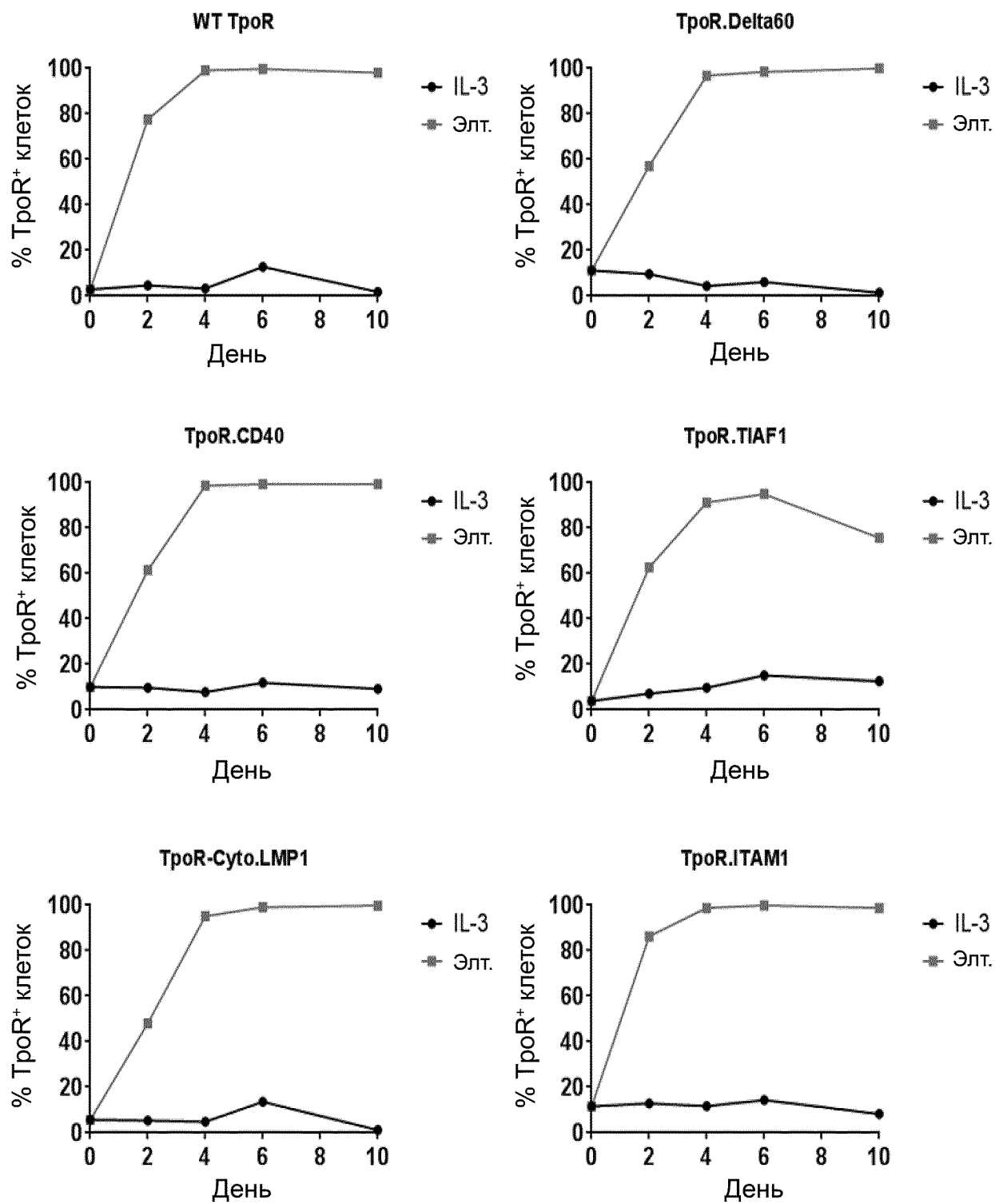
Фиг. 3



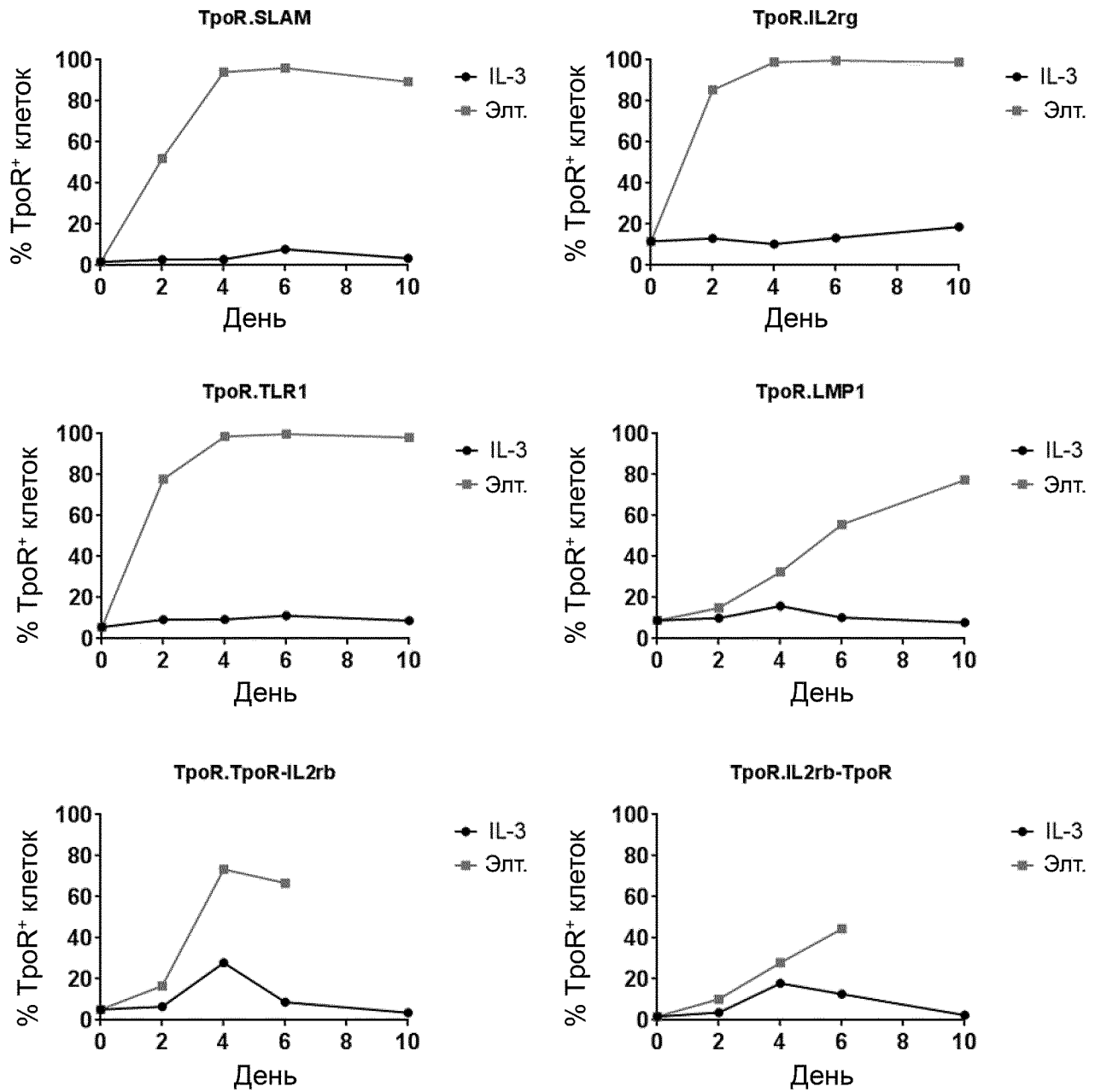
Фиг. 4



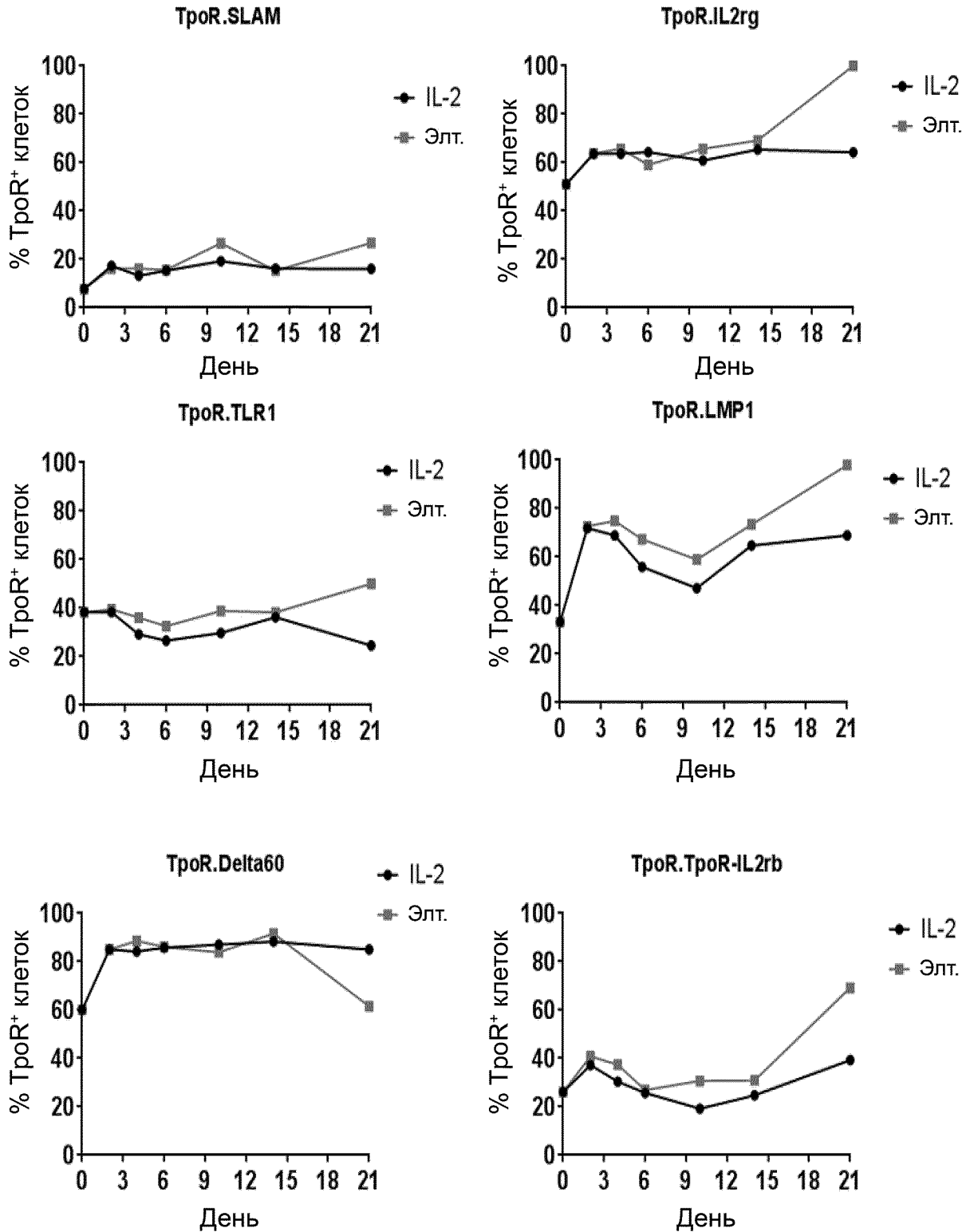
Фг. 5А



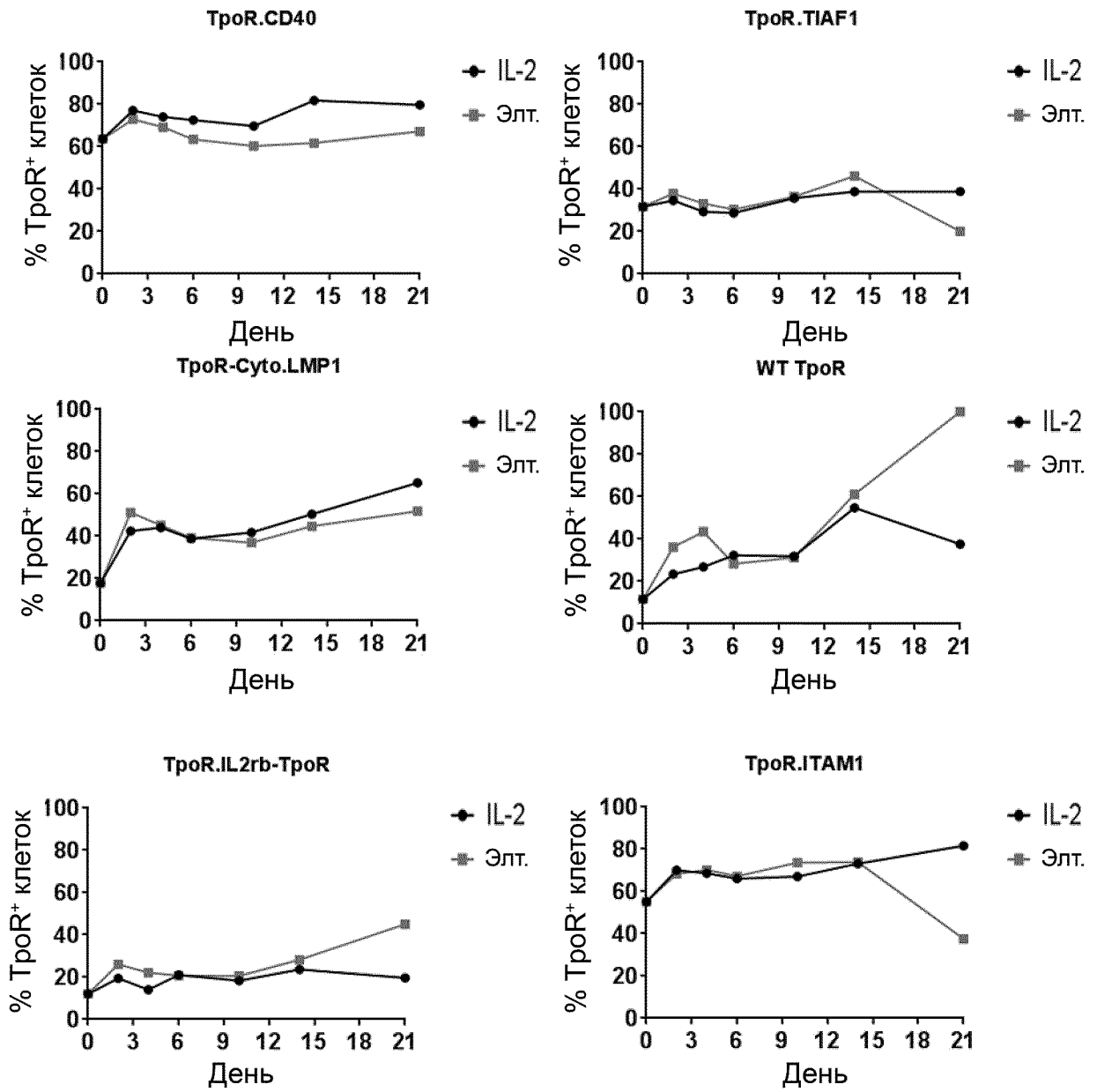
Фиг. 5В



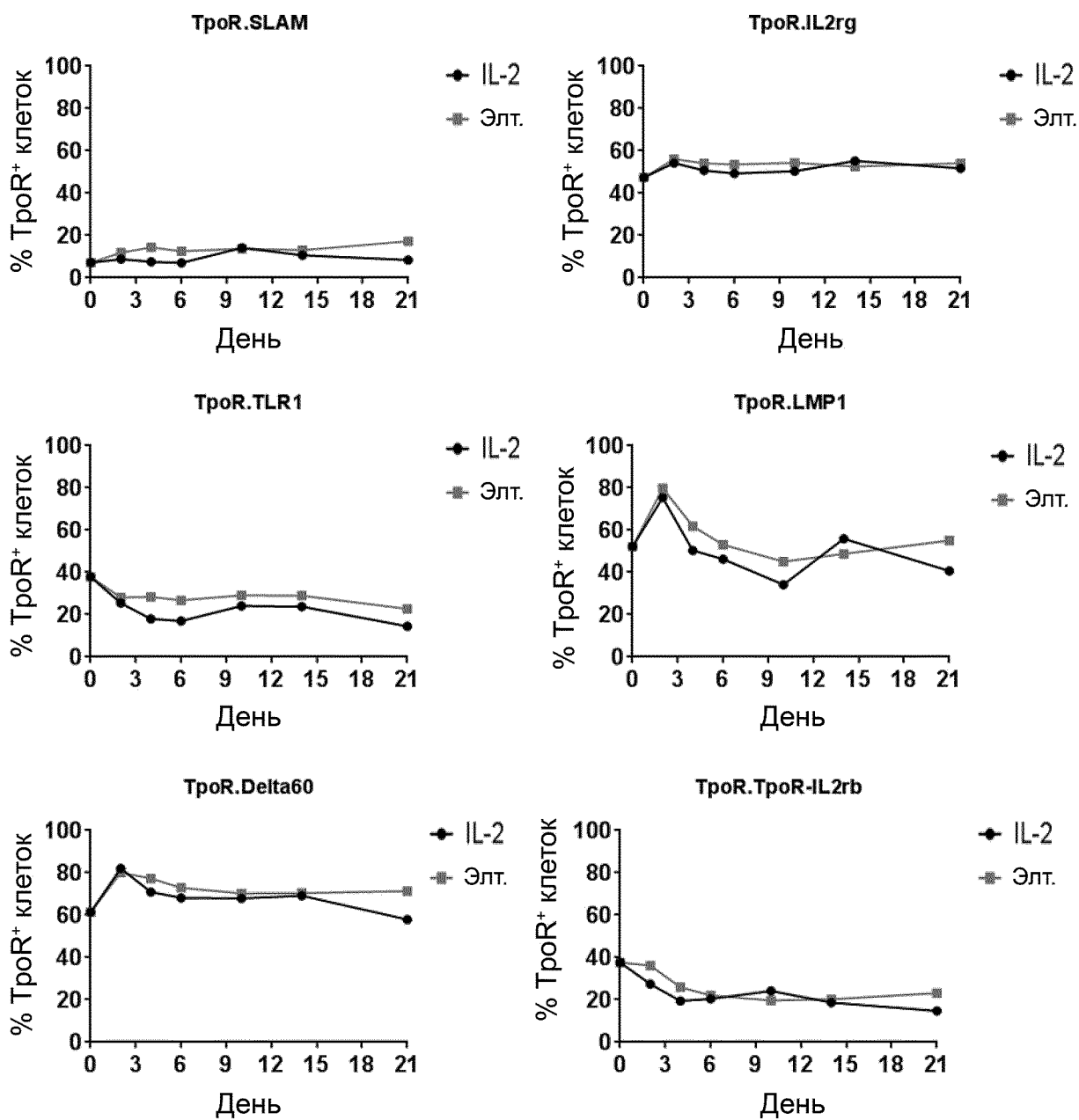
Фиг. 6А



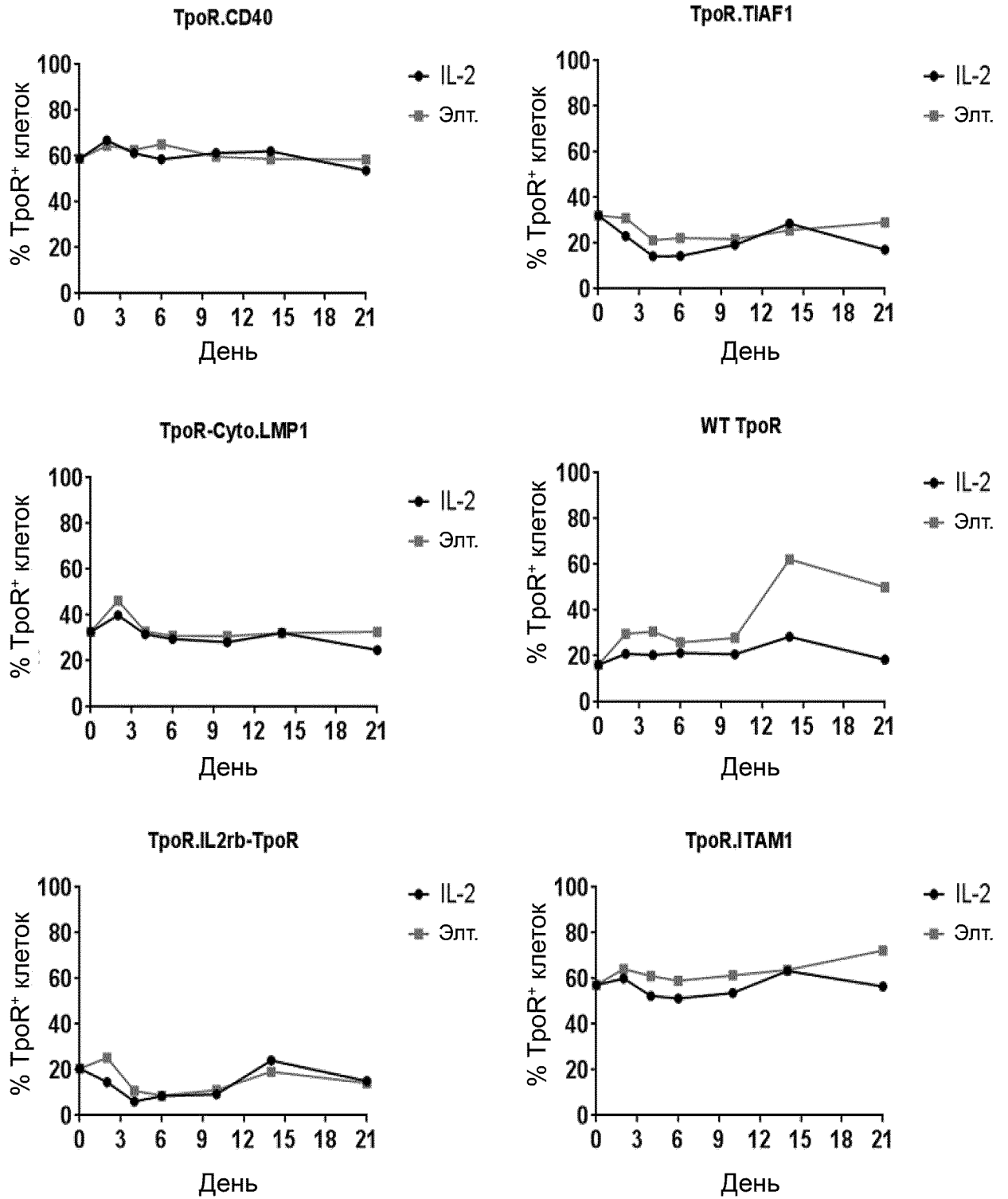
Фиг. 6В



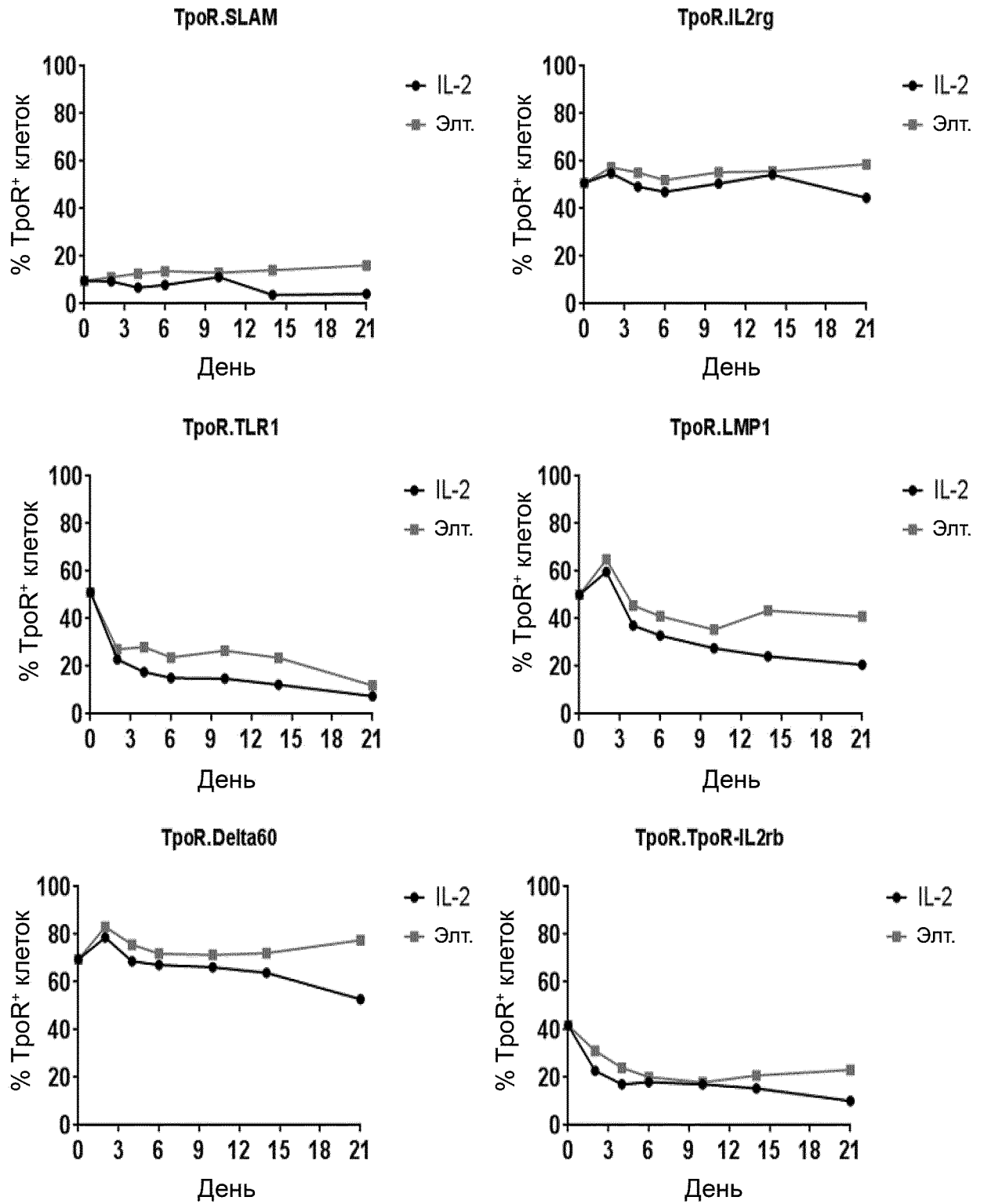
Фиг. 7А



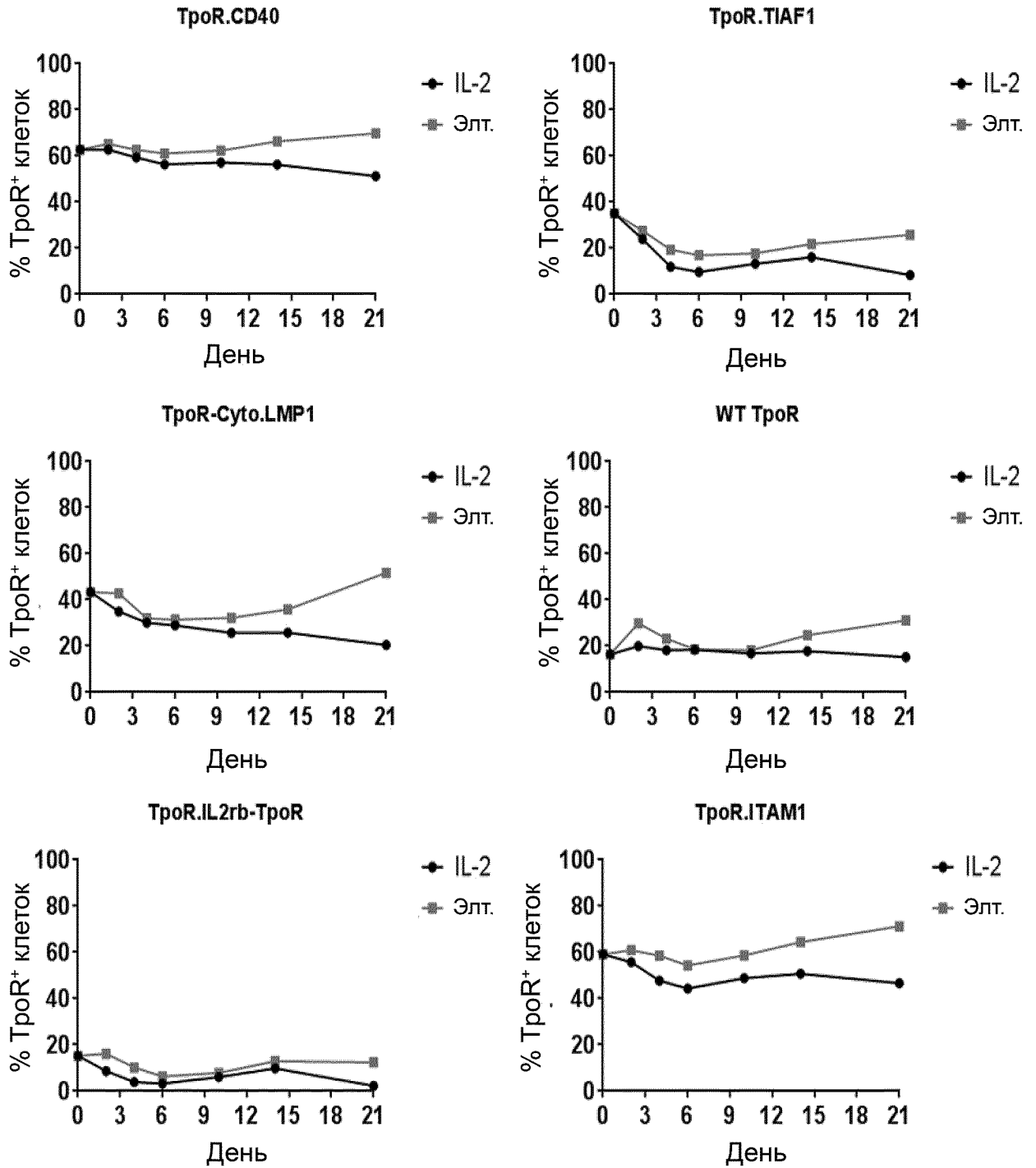
Фиг. 7В



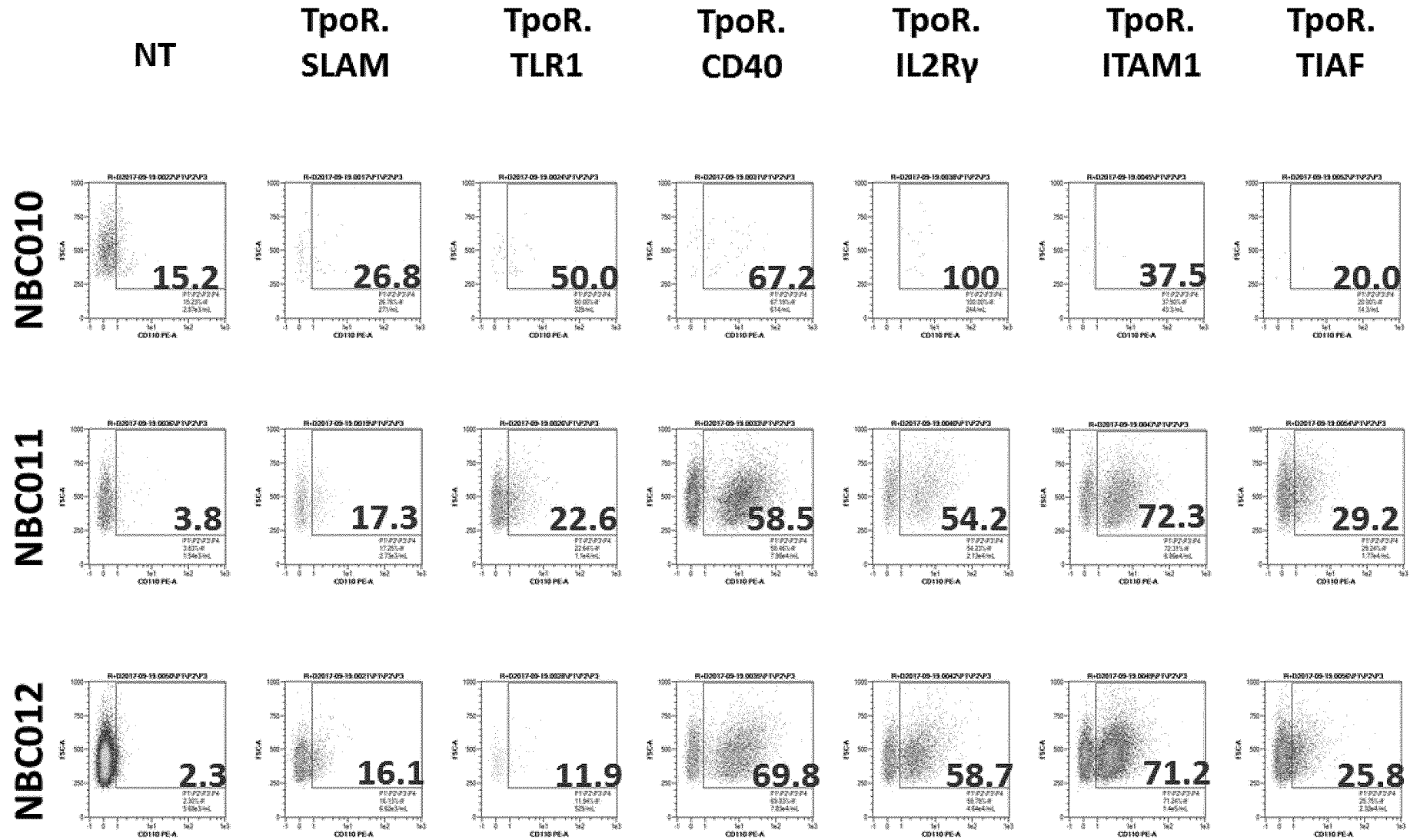
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 9А



Фиг. 9В

TpoR.
D60

TpoR.TpoR-
cyt.IL2rβ-cyt

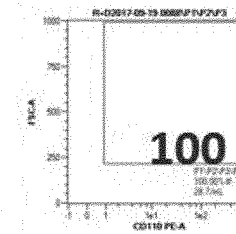
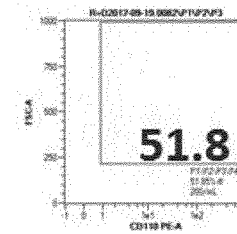
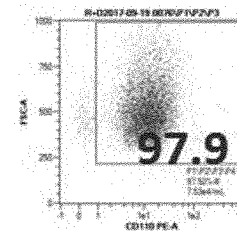
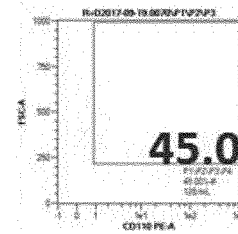
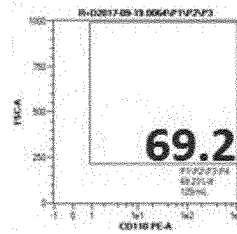
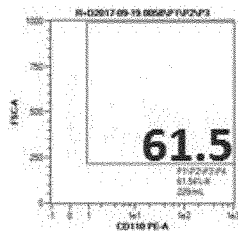
TpoR.IL2rβ-
cyt.TpoR-cyt

TpoR.
LMP1
-cyt

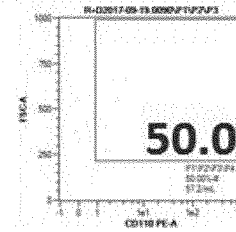
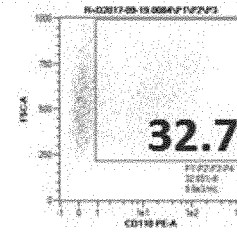
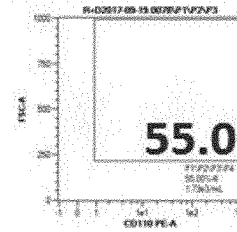
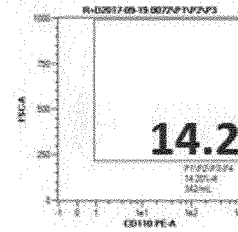
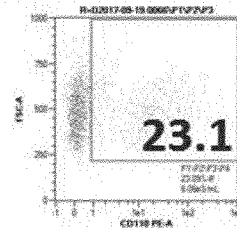
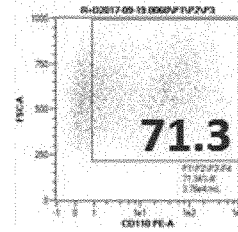
TpoR.TpoR
-cyt.LMP1-
cyt

TpoR.
WT

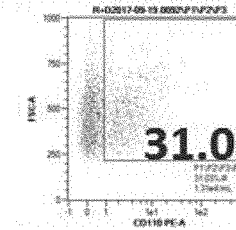
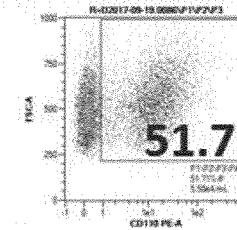
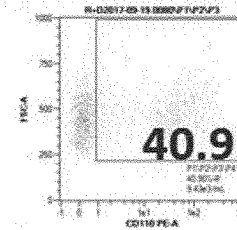
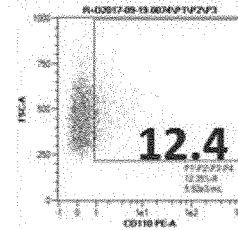
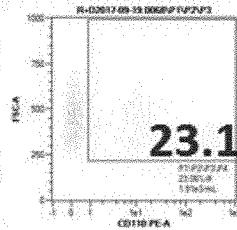
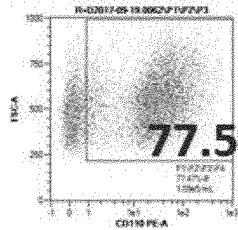
NBC010



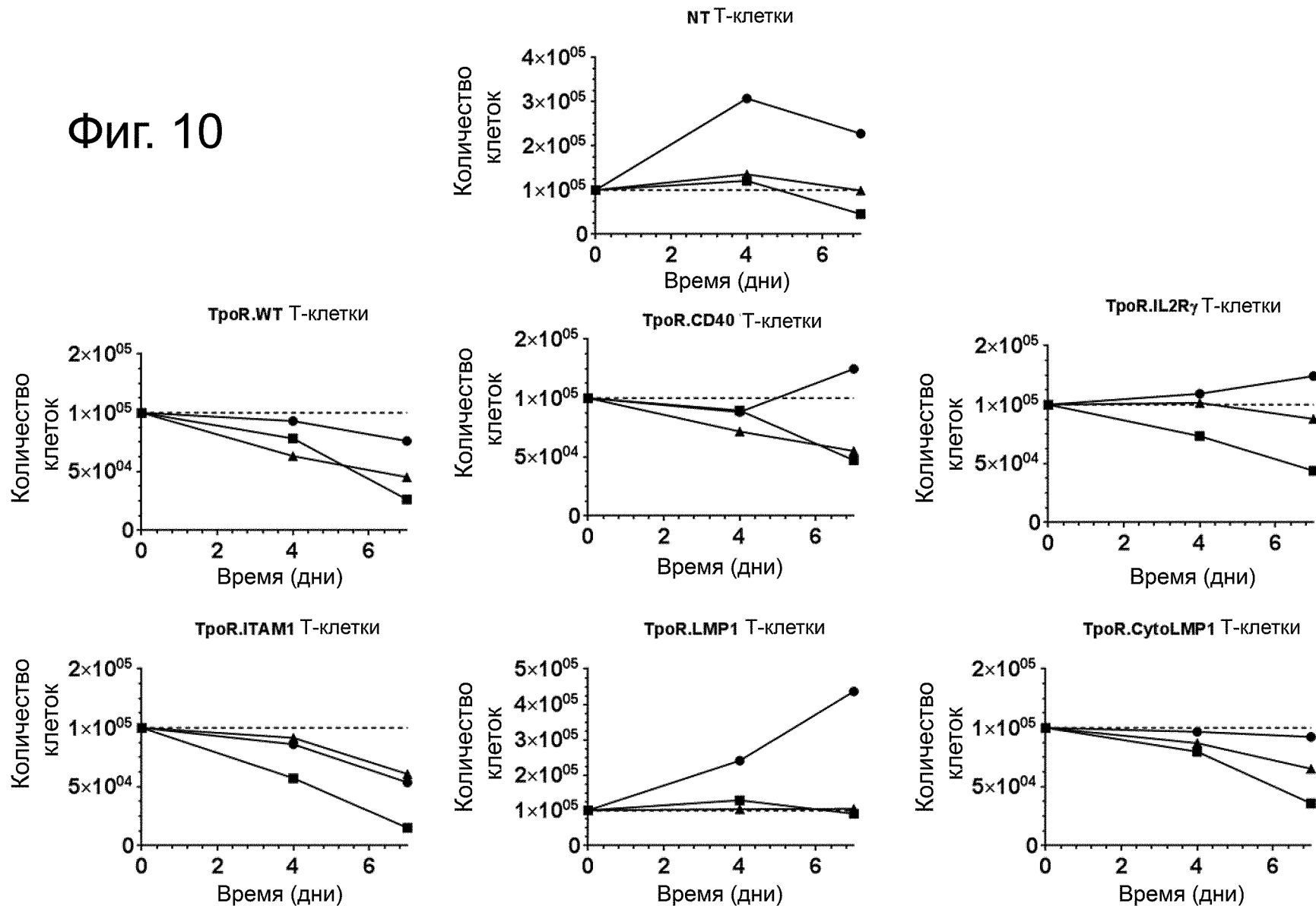
NBC011



NBC012



Фиг. 10

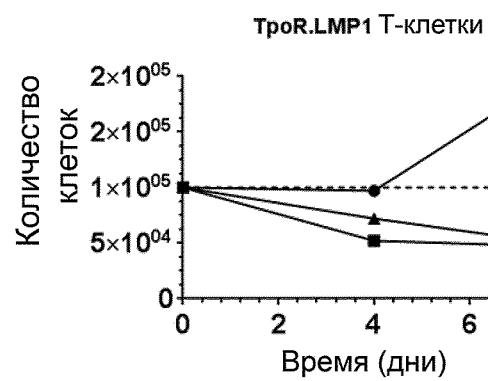
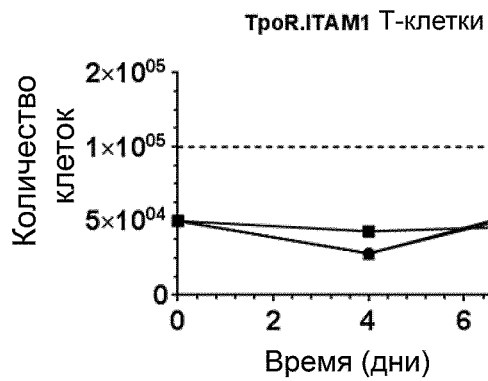
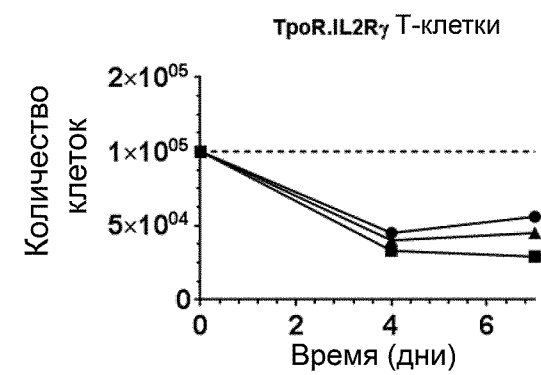
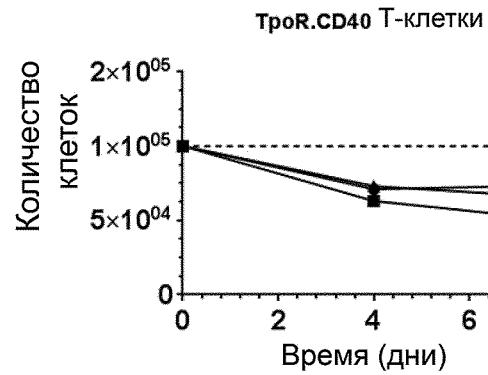
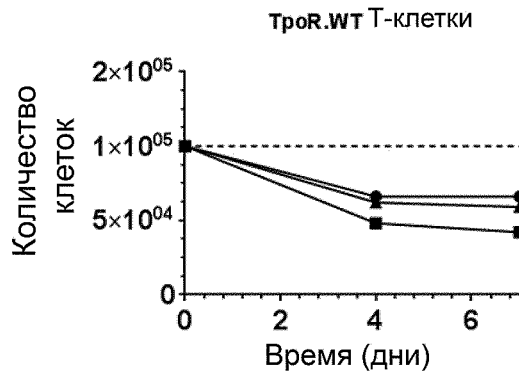
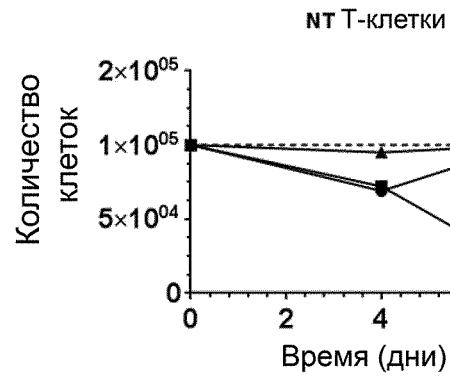


● IL-2

▲ Элтромбогаг

■ Только среда

Фиг. 11

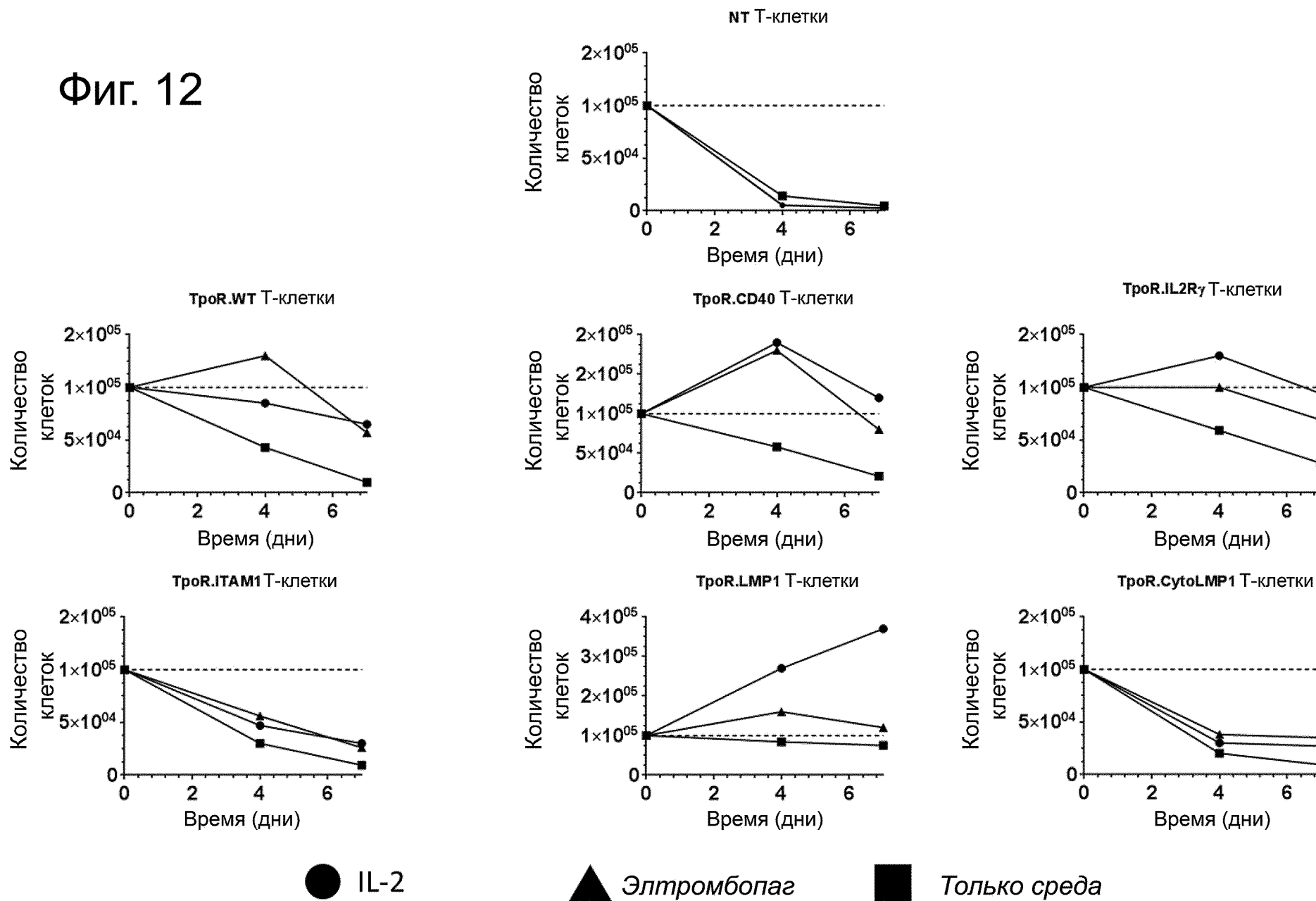


● IL-2

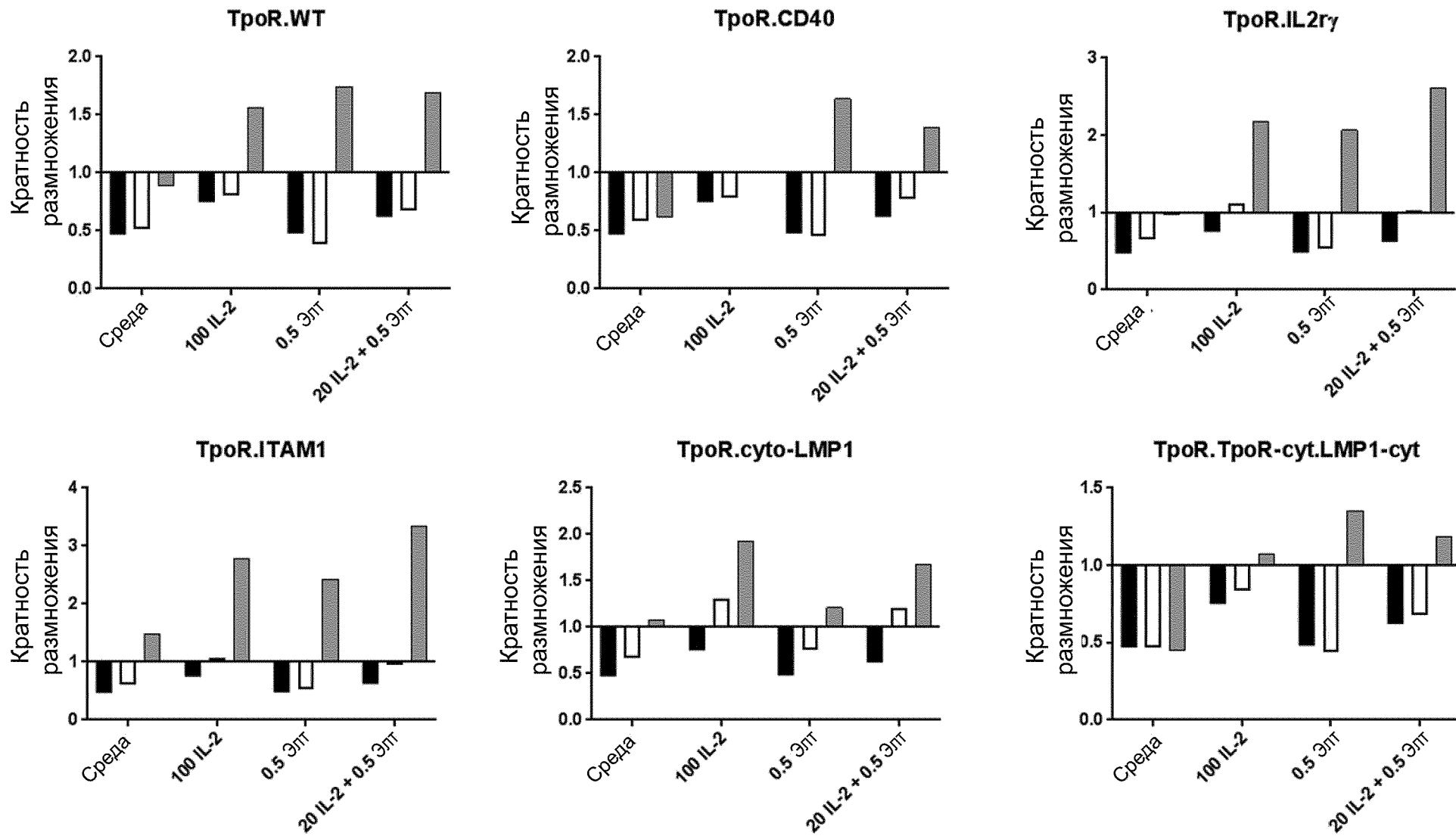
▲ Элтромбопэг

■ Только среда

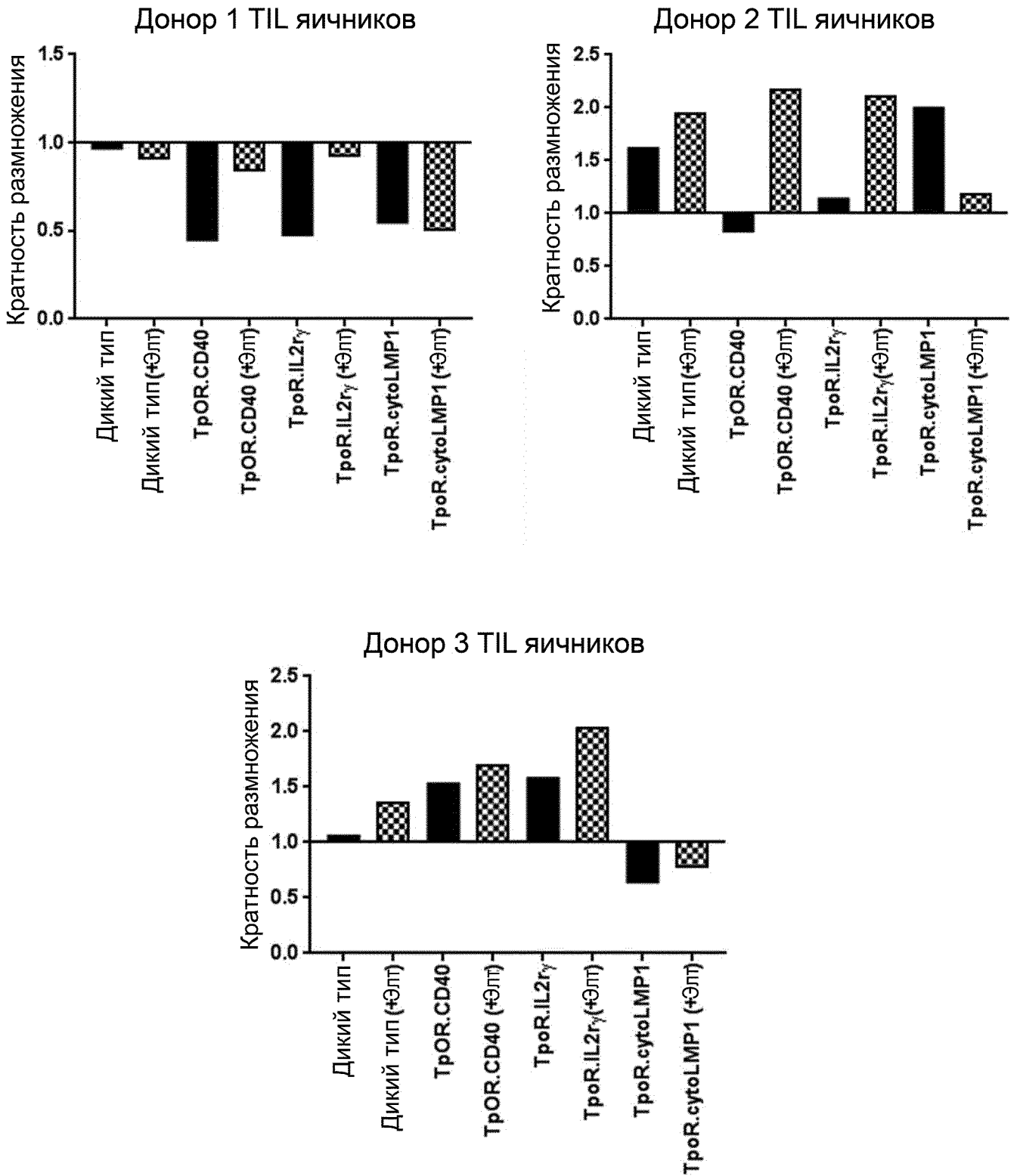
Фиг. 12



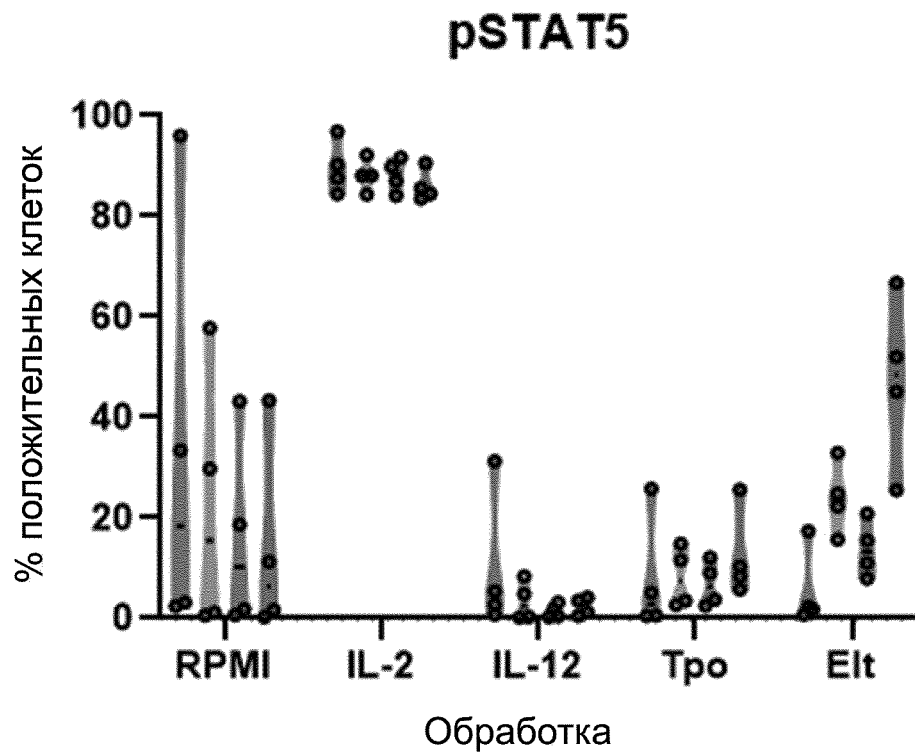
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Порядок для каждой обработки из L>R =
1 – Нетрансдуцированные клетки
2 – ТроR дикого типа
3 – ТроR.CD40
4 – ТроR.IL2γ