

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992483** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.06

(51) Int. Cl. **C12N 5/078** (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.25

(54) МАРКЕР ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

(31) **2017-087723**

(32) **2017.04.26**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2018/016864**

(87) **WO 2018/199186 2018.11.01**

(71) Заявитель:
**КИОТО ЮНИВЕРСИТИ; ТАКЕДА
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КОМПАНИ
ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:

**Канеко Син, Иригути Соити, Мисима
Юта, Кассаи Йосиаки, Хаяси Акира,
Арима Сугуру (JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу продуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, где указанный способ включает следующие стадии: 1) выделение из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c, и 2) дифференцировка клеток, выделенных в стадии 1, в клетки, позитивные по двум CD4/CD8.

A1

201992483

201992483

A1

МАРКЕР ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК–ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

[Область изобретения]

[0001] Настоящее изобретение относится к способу продуцирования CD8–позитивных клеток с использованием маркеров гемопоэтических клеток–предшественников одного или более видов (маркеров НРС) и популяции клеток, экспрессирующих маркеры НРС одного или более видов и т.п.

[0002] (Предпосылки создания изобретения)

Т–клетки играют главную роль в иммунной системе против чужеродных патогенов, таких как бактерии, вирусы и т.п., и против аномальных клеток, таких как раковые клетки и т.п. В частности, цитотоксический Т–лимфоцит (CTL) распознает, посредством Т–клеточного рецептора (TCR), присутствующего на клеточной поверхности, антигенные пептиды, происходящие от вирусов, опухолей и т.п. и презентируемые вместе с антигеном главного комплекса гистосовместимости класса 1 антигенпрезентирующих клеток, и обладает специфической цитотоксической активностью, направленной против клеток, презентирующих указанный антигенный пептид как чужеродное вещество.

[0003] Большинство CTL представляет собой клетки, позитивные по одному CD8 (SP). Известно, что вышеупомянутые CD8SP–клетки дифференцируются в тимусе незрелых клеток, не экспрессирующих TCR и не содержащих CD4 или CD8 (клеток, негативных по двум CD4/CD8 (в описании настоящей заявки, отсутствие двух антигенов иногда обозначается DN)), посредством клеток, экспрессирующих CD8 и CD4 (клеток, позитивных по двум CD4/CD8 (в описании настоящей заявки, присутствие двух антигенов иногда обозначается DP)).

[0004] Как упоминалось выше, поскольку Т–клетки играют важную роль в иммунной системе, то если Т–клетка может быть введена или регенерирована, то она становится в высокой степени эффективным средством для профилактики или лечения заболеваний, таких как опухоль, инфекция, аутоиммунное расстройство и т.п. Поэтому были предприняты попытки получить гемопоэтические клетки–предшественники и клетки Т–клеточной линии способом индуцирования гемопоэтических клеток–предшественников (иногда обозначаемых в настоящей заявке как НРС) из iPS–клеток, то есть, способом индуцирования CD4/CD8DP–клеток и т.п. Так, например, в непатентном документе 1 показано, что CD34/CD43DP–клетки могут быть индуцированы путем совместного культивирования iPS–клеток с фидерными клетками (в частности, клетками OP9). В патентном документе 1 и в непатентном документе 2 описаны: способ выделения НРС из клеточной популяции, содержащей НРС, индуцированные из человеческих плюрипотентных стволовых клеток, где экспрессия CD43 и CD34, CD31 или CD144 используется в качестве индекса; способ дифференцировки отдельных клеток в клетки Т–клеточной линии, а также показано, что в случае дифференцировки плюрипотентных

стволовых клеток в НРС, свойства индуцированных клеток линии дифференцировки крови значительно варьируется в зависимости от того, действует ли активин/Nodal на ранней стадии индуцирования или нет. В патентном документе 2 описан способ продуцирования CD4/CD8DP в условиях отсутствия фидерных клеток. Кроме того, в патентном документе 3 описаны различные способы индуцирования гемопоэтических клеток, включая гемопоэтические клетки–предшественники, из человеческих плюрипотентных стволовых клеток, и указывается, что низкая эффективность продуцирования является одной из причин, по которой клиническое применение клеток крови, индуцированных *in vitro*, не осуществлялось.

[Список документов]

[Патентные документы]

[0005] Патентный документ 1: WO 2013/075222

Патентный документ 2: WO 2017/221975

[Непатентные документы]

[0006] Непатентный документ 1: Choi K.D. et al., Stem Cells, 27 (2009); 559–567

Непатентный документ 2: Kennedy M. et al., Cell Reports, 2 (2012); 1722–1735

Непатентный документ 3: Liu S. et al., Cytotherapy, 17 (2015); 344–358

[СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ]

[Проблемы, которые могут быть решены с помощью настоящего изобретения]

[0007] Целью настоящего изобретения является получение большого числа клеток Т–клеточной линии (например, CD8–позитивных клеток (например, CD4/CD8DP–клеток, CD8SP–клеток)) и/или их получение в повышенных концентрациях (то есть, разработка способа продуцирования клеток) для проведения стабильной клеточной терапии. Кроме того, целью настоящего изобретения является получение клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, для решения вышеупомянутых проблем.

[Способы решения указанных проблем]

[0008] Для разработки способа продуцирования CD4/CD8DP–клеток, который позволит решить вышеупомянутую проблему, авторами настоящего изобретения были идентифицированы маркеры, экспрессируемые на поверхности НРС (маркеры НРС). Кроме того, авторами было обнаружено, что НРС, выделенные из клеточной популяции, содержащей НРС, с использованием маркеров одного или более видов, обнаруживают высокую эффективность дифференцировки в CD8–позитивные клетки (например, CD4/CD8DP–клетки), а также высокую активность пролиферации, то есть, может быть получено большее число CD8–позитивных клеток (например, CD4/CD8DP–клеток), и/или эти клетки могут быть получены в более высоких концентрациях в клеточной популяции с использованием маркеров НРС одного или более видов. Кроме того, авторами было обнаружено, что способ продуцирования согласно изобретению дает меньшую вариабельность выхода и может стабильно продуцировать CD8–позитивные клетки (например, CD4/CD8DP–клетки), в результате чего может быть осуществлено настоящее

изобретение.

[0009] Следовательно, настоящее изобретение включает:

[1] Способ продуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, где указанный способ включает следующие стадии:

стадию 1: выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c, и

стадию 2: дифференцировки клеток, выделенных в стадии 1, в клетки, позитивные по двум CD4/CD8.

[2] Способ по [1], где клетки, отобранные в вышеупомянутой стадии 1, не экспрессируют CD235a или CD14, но экспрессируют CD45, CD34 и CD43.

[3] Способ по [1] или [2], где вышеупомянутая стадия 1 включает выделение из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325.

[4] Способ по [3], где первая группа в вышеупомянутой стадии 1 состоит из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD7 и CD144.

[5] Способ по [1] или [2], где вышеупомянутая стадия 1 включает выделение из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c.

[6] Способ по [5], где вторая группа в вышеупомянутой стадии 1 состоит из CD49f, CD51 и CD102.

[7] Способ по любому из [1]–[6], где клеточную популяцию, содержащую гемопоэтические клетки–предшественники в вышеупомянутой стадии 1, получают путем индуцирования дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

[8] Способ по [7], где вышеупомянутыми плюрипотентными стволовыми клетками являются человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[9–1] Способ получения клеток, позитивных по одному CD8, включающий стадию индуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, и полученных способом по любому из [1]–[8], в клетки, позитивные по одному CD8.

[9–2] Способ по [9–1], где вышеупомянутая стадия индуцирования, например, включает культивирование клеток, позитивных по двум CD4/CD8, в присутствии гормона коры надпочечников, антитела и/или цитокина, где предпочтительно, гормон коры надпочечников представляет собой дексаметазон, и/или антитело представляет собой

анти-CD3 антитело, и/или цитокин представляет собой IL-2.

[10] Способ по [9-1] или [9-2], где вышеупомянутые клетки, позитивные по одному CD8, представляют собой цитотоксические Т-лимфоциты.

[11] Клеточную популяцию, полученную путем выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c.

[12] Клеточную популяцию по [11], где выделенная клетка не экспрессирует CD235a или CD14 и экспрессирует CD45, CD34 и CD43.

[13] Клеточную популяцию по [11] или [12], где вышеупомянутую клеточную популяцию, содержащую гемопоэтические клетки-предшественники, получают путем индуцирования дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

[14] Клеточную популяцию по [13], где вышеупомянутыми плюрипотентными стволовыми клетками являются человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[15] Клеточную популяцию, содержащую гемопоэтические клетки-предшественники, экспрессирующие молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или гемопоэтические клетки-предшественники, не экспрессирующие молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c, в отношении [число гемопоэтических клеток-предшественников/общее число клеток в клеточной популяции] не менее, чем 40%.

[16] Клеточную популяцию по [15], где указанным отношением является отношение гемопоэтических клеток-предшественников, также экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD7 и CD144.

[17] Клеточную популяцию по [15], где указанным отношением является отношение гемопоэтических клеток-предшественников, также не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51 и CD102.

[18] Реагент для разделения гемопоэтических клеток-предшественников, где указанный реагент включает антитело против каждой из молекул одного или более видов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262, CD325, CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c.

[19] Реагент по [18], также включающий антитела одного или более видов против CD235a, CD14, CD45, CD34 и/или CD43.

[20] Способ детектирования белка на поверхности гемопоэтических клеток–предшественников, где указанный способ включает контактирование гемопоэтических клеток–предшественников с реагентом, который специфически связывается с CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262, CD325, CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102, CD109 или CD156c.

[21] Способ в соответствии с [20], где реагент содержит антитело или его фрагмент.

[22] Способ в соответствии с [20] или [21], где реагент также содержит флуорофор.

[23] Способ в соответствии с любым из [20]–[22], также включающий контактирование гемопоэтических клеток–предшественников с реагентом, который специфически связывается с CD34, CD43, CD14, или CD235a.

[24] Способ детектирования множества белков на поверхности гемопоэтических клеток–предшественников, где указанный способ включает контактирование гемопоэтических клеток–предшественников с реагентом, который специфически связывается с каждым из множества белков, где множество белков включает любую комбинацию белков двух или более видов, выбранных из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или всех 29: CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262, CD325, CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102, CD109 и CD156c.

[25] Способ отбора гемопоэтических клеток–предшественников из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, где указанный способ включает детектирование присутствия или отсутствия белков одного или более видов на поверхности клетки в соответствии со способом по любому из [20] – [24], и отбор клеток, если:

(i) на поверхности клеток детектируются нижеследующие белки одного или более видов: CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или если:

(ii) на поверхности клеток не детектируются нижеследующие белки одного или более видов: CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102, CD109 и CD156c.

[26] Способ в соответствии с [25], где клетку отбирают, если на ее поверхности детектируются нижеследующие белки одного или более видов: CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD7 и CD144.

[27] Способ в соответствии с [25] или [26], где клетку отбирают, если на ее поверхности не детектируются нижеследующие белки одного или более видов: CD49f, CD51 и CD102.

[28] Способ отбора гемопоэтических клеток–предшественников из клеточной

популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, где указанный способ включает детектирование присутствия или отсутствия белков одного или более видов на поверхности клетки в соответствии со способом по любому из [20] – [24], и отбор клеток, если:

(i) на поверхности клеток детектируются CD45, CD34 и/или CD43 и нижеследующие белки одного или более видов: CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или если:

(ii) на поверхности клеток не детектируются CD14 и/или CD235a, и на поверхности клеток также не детектируются нижеследующие белки одного или более видов: CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102, CD109 и CD156c.

[Эффект изобретения]

[0010] Способ продуцирования согласно изобретению с использованием маркеров НРС одного вида позволяет получить большее число CD8–позитивных клеток (например, CD4/CD8DP–клеток, CD8SP–клеток) и/или получить CD8–позитивные клетки в более высокой концентрации. Кроме того, способ продуцирования согласно изобретению позволяет получить стабильные CD8–позитивные клетки (например, CD4/CD8DP–клетки, CD8SP–клетки) с меньшей вариабельностью выхода. Таким образом, способ продуцирования согласно изобретению представляет собой усовершенствованный способ выделения гемопоэтических клеток–предшественников из популяции клеток. Это позволяет получить улучшенный источник клеток для продуцирования CD8–позитивных клеток. Этот новый способ продуцирования основан на удивительном и неожиданном обнаружении авторами того факта, что некоторые НРС–позитивные маркеры и НРС–негативные маркеры могут быть использованы для значительного улучшения качества и/или увеличения количества CD8–позитивных клеточных популяций, происходящих от НРС. Этот предпочтительный источник CD8–позитивных клеток согласно изобретению позволяет получить улучшенные CD8–позитивные клеточные популяции для их применения в клинических целях (например, в клеточной терапии, в диагностике и для введения *in vitro*).

[0011] (Подробное описание изобретения)

Настоящее изобретение относится к способу продуцирования CD8–позитивных клеток (например, CD4/CD8DP–клеток), включающему (стадия 1) выделение клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток–предшественников одного или более видов (иногда сокращенно называемых в настоящем описании «маркерами НРС»), и/или клеток, не экспрессирующих маркеры НРС одного или более видов из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, и (стадия 2) дифференцировку клеток, выделенных в стадии 1, в CD8–позитивные клетки (например, клетки, позитивные по двум CD4/CD8 (иногда сокращенно называемые в настоящем описании «CD4/CD8DP–клетками»))(далее в настоящем изобретении, это способ будет сокращенно называться «способом продуцирования согласно изобретению») и т.п.

[0012] В настоящем изобретении, «CD8–позитивная клетка» означает клетку, экспрессирующую CD8, и их примерами являются CD4/CD8DP–клетка и клетка, позитивная по одному CD8 (иногда сокращенно называемая в настоящем описании «CD8SP–клеткой»). В настоящем изобретении, «CD4/CD8DP–клетка» означает Т–клетку, одновременно экспрессирующую CD4 и CD8, а «CD8SP–клетка» означает Т–клетку, которая не экспрессирует CD4, но экспрессирует CD8. Примерами CD8SP–клеток являются цитотоксический Т–лимфоцит и его клетка–предшественник. Кроме того, в настоящем изобретении, «Т–клетка» означает, например, клетку, экспрессирующую антигенный рецептор, называемый Т–клеточным рецептором (TCR), на ее поверхности, и ее клетку–предшественника (например, про–Т–клетку, которая не экспрессирует TCR (TCR $\alpha\beta$), пре–Т–клетку, в которой TCR β и пре–TCR α являются ассоциированными).

[0013] В настоящем изобретении, «гемопозитическая клетка–предшественник» означает CD34–позитивную клетку, а предпочтительно, CD34/CD43DP–клетку. Производные гемопозитических клеток–предшественников, используемых в настоящем изобретении, не имеют конкретных ограничений и могут представлять собой, например, гемопозитическую клетку–предшественника, индуцированную *in vitro* (например, гемопозитическую клетку–предшественника, полученную путем индуцирования дифференцировки плюрипотентной стволовой клетки) известным методом (например, методами, описанными в патентных документах 1, 2, и в непатентных документах 1–3), или гемопозитическую клетку–предшественника, выделенную из биологической ткани известным методом.

[0014] Примерами плюрипотентных стволовых клеток являются эмбриональная стволовая клетка (ES–клетка), индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (iPS–клетка), эмбриональная клетка карциномы (EC–клетка) и эмбриональная зародышевая клетка (EG–клетка), а предпочтительно, iPS–клетка (более предпочтительно, человеческая iPS–клетка). Если вышеупомянутой плюрипотентной стволовой клеткой является ES–клетка или любая клетка, происходящая от человеческого эмбриона, то такая клетка может быть получена путем разрушения эмбриона или без его разрушения, причем, предпочтительной является клетка, полученная без разрушения эмбриона.

[0015] Вышеупомянутой iPS–клеткой является искусственная стволовая клетка, происходящая от соматической клетки, свойства которой являются почти такими же, как свойства ES–клетки, например, плюрипотентность и способность пролиферироваться посредством ауторепликации, и такая клетка может быть получена путем введения конкретных факторов перепрограммирования в форме ДНК или белка в соматическую клетку (см., например, Takahashi K. и Yamanaka S. (2006) *Cell*, 126; 663–676; Takahashi K. et al. (2007) *Cell*, 131; 861–872; Yu J. et al. (2007) *Science*, 318; 1917–1920; Nakagawa M. et al. (2008) *Nat. Biotechnol.* 26; 101–106). Если используется iPS–клетка, то она может быть получена из соматической клетки методом, известным *per se*, либо может быть также использована iPS–клетка, которая уже была продуцирована и культивирована. Хотя соматическая клетка, от которой происходит iPS–клетка, используемая в настоящем

изобретении, не имеет конкретных ограничений, однако, предпочтительной является клетка, происходящая от периферической крови или пуповинной крови. Животные, от которых происходит плюрипотентная стволовая клетка, не имеют конкретных ограничений, например, такими животными являются млекопитающие, такие как мыши, крысы, хомячки, морские свинки, собаки, обезьяны, орангутанги, шимпанзе, человек и т.п., но предпочтительным является человек.

[0016] Гемопозитическая клетка–предшественник может быть получена путем обработки вышеупомянутой плюрипотентной стволовой клетки методом, известным *per se*. Если вышеупомянутой плюрипотентной стволовой клеткой является iPS–клетка, то гемопозитическая клетка–предшественник может быть получена методом, описанным, например, в WO 2017/221975.

[0017] Вышеупомянутая биологическая ткань не имеет конкретных ограничений, при условии, что она содержит гемопозитические клетки–предшественники. Примерами являются периферическая кровь, лимфоузел, костный мозг, тимус, селезенка и пуповинная кровь. Из них предпочтительными являются периферическая кровь и пуповинная кровь, поскольку они имеют низкую степень инвазивности у животных и могут быть легко получены.

[0018] Гемопозитическими клетками–предшественниками и плюрипотентными стволовыми клетками, используемыми в настоящем изобретении, предпочтительно, являются клетки, удовлетворяющие стандартам GMP (Стандартам по приготовлению лекарственных средств) в соответствии с аспектами их применения для лечения.

[0019] В настоящем изобретении, «маркер НРС» означает любую молекулу, выбранную из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, представляющих собой молекулы, которые могут экспрессироваться на поверхности гемопозитической клетки–предшественника (в настоящем описании, эти маркеры иногда называются «маркером(ами), позитивным(и) по НРС», «маркером(ами) отбора, позитивным(и) по НРС» или «позитивным(и) маркером(ами) НРС»), или любую молекулу, выбранную из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c, представляющих собой молекулы, которые обычно не экспрессируются на поверхности гемопозитической клетки–предшественника (в настоящем описании, эти маркеры иногда называются «маркером(ами), негативным(и) по НРС», «маркером(ами) отбора, негативным(и) по НРС» или «негативным(и) маркером(ами) НРС»)(в описании настоящей заявки, маркер, позитивный по НРС и маркер, негативный по НРС, иногда называются общим термином «маркер(ы) НРС согласно изобретению»). Из этих НРС–позитивных маркеров согласно изобретению, предпочтительными являются CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD200, CD7 или CD144, а более предпочтительными являются CD90, CD143, CD218a или CD200. В другом варианте осуществления изобретения, предпочтительными являются CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200 или CD218a, а более предпочтительными являются CD24,

CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200 или CD218a. В настоящем изобретении, клетка, экспрессирующая вышеупомянутый НРС–позитивный маркер, также иногда называется клеткой, позитивной по маркеру НРС (или клеткой, позитивной по маркеру НРС), и, например, клетка, экспрессирующая молекулу CD24, иногда называется клеткой, позитивной по CD24. Из НРС–негативных маркеров согласно изобретению, предпочтительными являются CD49f, CD51 или CD102. В настоящем изобретении, клетка, которая не экспрессирует вышеупомянутые НРС–негативные маркеры, иногда называется клеткой, негативной по маркеру НРС.

[0020] В репрезентативном варианте осуществления изобретения, CD8–позитивные клетки, предпочтительно, клетки, позитивные по двум CD4/CD8, получают путем выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток (а) экспрессирующих CD34 и CD43, и (b) экспрессирующих CD62L, CD24, CD90, CD143, CD218a, CD263 или Notch3, и (c) не экспрессирующих CD235a или CD14.

[0021] В репрезентативном варианте осуществления изобретения, CD8–позитивные клетки, предпочтительно, клетки, позитивные по двум CD4/CD8, получают путем выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток (а) экспрессирующих CD34 и CD43, и (b) экспрессирующих CD90, CD143, CD200, CD218a или CD263 и (c) не экспрессирующих CD235a или CD14.

[0022] В репрезентативном варианте осуществления изобретения, CD8–позитивные клетки, предпочтительно, клетки, позитивные по двум CD4/CD8, получают путем выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, (а) экспрессирующих CD34 и CD43, и (b) экспрессирующих CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 или CD325 и (c) не экспрессирующих CD235a или CD14.

[0023] В репрезентативном варианте осуществления изобретения, CD8–позитивные клетки, предпочтительно, клетки, позитивные по двум CD4/CD8, получают путем выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, экспрессирующих (а) CD34 и CD43, и (b) не экспрессирующих CD49f, CD51, CD426, CD61, CD62P, CD69 или CD156с, и (c) не экспрессирующих CD235a или CD14.

[0024] В настоящем изобретении, термин «экспрессирующий» означает, что экспрессия может быть детектирована методом, применяемым для разделения клеток, а «не экспрессирующий» означает, что детектирование не может быть достигнуто в нужных пределах чувствительности методом, применяемым для разделения клеток. В качестве метода, применяемого для разделения клеток, может служить метод, осуществляемый на основе нижеупомянутой проточной цитометрии или масс–цитометрии, метод магнитного разделения клеток и т.п.

[0025] В качестве клеток, разделенных в вышеупомянутой стадии 1, может служить клетка, экспрессирующая НРС–позитивные маркеры одного или более видов, и клетка, не

экспрессирующая НРС–негативные маркеры одного или более видов. В одном из вариантов осуществления изобретения, клетки, разделенные в вышеупомянутой стадии 1, представляют собой клетки, которые экспрессируют, помимо НРС–позитивных маркеров согласно изобретению одного или более видов, CD34 и/или CD43, и/или клетки, которые не экспрессируют НРС–негативные маркеры одного или более видов согласно изобретению и экспрессируют CD34 и/или CD43. Выделяемой клеткой предпочтительно, является CD235a–негативная, CD14–негативная и/или CD45–позитивная клетка. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления изобретения, вышеупомянутую стадию 1 осуществляют путем выделения клеток одного или более видов, которые являются CD235a–негативными, CD14–негативными, CD45–позитивными, CD34–позитивными и CD43–позитивными, и позитивными по НРС–позитивному(ым) маркеру(ам) одного или более видов согласно изобретению, и/или клеток, негативных по НРС–негативным маркерам согласно изобретению одного или более видов, из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники.

[0026] В настоящем изобретении, термин «разделение клеток» охватывает вариант, включающий отбор клеток, экспрессирующих НРС–позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС–негативные маркеры одного или более видов, а также выделение отобранных клеток, и вариант, включающий обработку отобранных клеток в следующей стадии дифференцировки.

[0027] Каждый из используемых здесь терминов, таких как «содержащий» или «содержит» может быть, но необязательно, заменен термином «состоящий из» или «состоит из».

[0028] Примерами способов выделения клеток, экспрессирующих НРС–позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС–негативные маркеры одного или более видов, из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, являются способ, проводимый с использованием проточной цитометрии или масс–цитометрии, способ магнитного разделения клеток и т.п., и эти способы могут быть осуществлены известными методами. Так, например, клетка, экспрессирующая НРС–позитивные маркеры одного или более видов, и/или клетка, не экспрессирующая НРС–негативные маркеры одного или более видов, могут быть разделены способом, включающим стадию контактирования клетки с веществом (например, с антителом), которое специфически связывается с каждым из маркеров НРС. Вышеупомянутое вещество включает вещество, непосредственно добавленное с детектируемой меткой (например, GFP), и вещество, которое не было непосредственно добавлено с меткой. Если вышеупомянутое вещество не было непосредственно добавлено с меткой, то вышеупомянутое разделение может быть осуществлено дополнительно с использованием вещества, добавленного с детектируемой меткой, которая непосредственно или опосредованно распознает вещество. Так, например, если вышеупомянутым веществом является антитело, то антитело может содержать, непосредственно или опосредованно, флуоресцентный краситель, изотоп металла или

сферу (например, магнитную сферу) для мечения маркера НРС на клеточной поверхности. Клетки могут быть разделены на основе такой метки. Используемым здесь антителом могут быть антитела только одного вида или двух или более видов.

[0029] Примерами методов дифференцировки клеток, выделенных как клетки, экспрессирующие НРС–позитивные маркеры одного или более видов, и/или клетки, не экспрессирующие НРС–негативные маркеры одного или более видов согласно изобретению, из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, в CD8–позитивные клетки, являются известные методы (например, методы, описанные в WO 2016/076415, *Journal of Leukocyte Biology* 96(2016)1165–1175, *Cell Reports* 2(2012) 1722–1735, WO 2017/221975).

[0030] 1. Способ продуцирования CD4/CD8DP–клеток

Примерами базальной среды для культивирования клеток, используемой в стадии 2 способа продуцирования согласно изобретению, являются среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков (IMDM); среда 199; минимальная поддерживающая среда Игла (EMEM); среда α MEM; модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM); среда Хэмса F12; среда RPMI 1640; среда Фишера; нейробазальная среда (Life Technologies) и их смесь. Среда может содержать, а может и не содержать, сыворотку. Если это необходимо, то базальная среда может также содержать одно или более веществ, выбранных из витаминов С (например, аскорбиновой кислоты, фосфата витамина С), альбумина, инсулина, трансферина, селена, жирной кислоты, микроэлементов, 2–меркаптоэтанола, тиола–глицерина, липидов, аминокислот, L–глутамина, заменимых аминокислот, витаминов, факторов роста, низкомолекулярных соединений, антибиотиков, антиоксидантов, пировиноградной кислоты, буферов, неорганических солей, цитокинов и т.п.

[0031] Вышеупомянутая среда, предпочтительно, содержит цитокин. В качестве цитокина могут быть использованы IL–7, FLT–3L, SCF, TPO и их комбинация и т.п., а предпочтительными являются FLT–3L и IL–7. Концентрация IL–7 в среде, предпочтительно, составляет 1 нг/мл – 50 нг/мл (например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл), а особенно предпочтительно, 5 нг/мл. Концентрация FLT–3L в среде, предпочтительно, составляет 1 нг/мл – 100 нг/мл (например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл), а особенно предпочтительно, 10 нг/мл. Специалист в данной области может самостоятельно определить концентрацию других цитокинов исходя из условий культивирования и т.п. Среда, предпочтительно, содержит лиганд Notch (например, гибридный белок Dll1, Dll4, Dll1 или Dll4 и Fc). При использовании лиганда Notch, он может быть добавлен в среду или нанесен на поверхность контейнера с культурой. Кроме того, может быть также использована фидерная клетка, экспрессирующая лиганд Notch.

[0032] В способе продуцирования согласно изобретению, гемопоэтические клетки–предшественники, полученные в стадии 1, могут быть культивированы в виде

адгезионной культуры или суспензионной культуры. В случае адгезионной культуры, может быть использован сосуд для культивирования с покрытием, и гемопоэтические клетки–предшественники могут быть совместно культивированы с фидерными клетками или другими клетками. Для применения в терапии, предпочтительно, чтобы культура не содержала фидерных клеток. Примерами субстрата для покрытия контейнера с культурой являются фрагмент фибронектина (например, ретронектин), пронектин, витронектин, Матригель (BD), коллаген типа I, коллаген типа IV, желатин, ламинин, протеогликан, содержащий гепарансерную кислоту и их комбинация. В качестве фидерных клеток, подвергаемых совместному культивированию, могут служить, например, клетки интерстициальной клеточной линии костного мозга OP9, клетки мышечной мезенхимальной клеточной линии 10T1/2 и клетки Tst-4. При использовании фидерных клеток, эти клетки, предпочтительно, должны быть заменены в процессе культивирования. Замена фидерных клеток может быть осуществлена путем переноса рассматриваемых клеток, которые культивируют на предварительно засеянных фидерных клетках. Замену, предпочтительно, осуществляют через каждые 2–5 дней.

[0033] В настоящем изобретении, температура культивирования гемопоэтических клеток–предшественников для индуцирования CD4/CD8DP–клеток не имеет конкретных ограничений. Такая температура, предпочтительно, составляет, приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C, а более предпочтительно, приблизительно от 37°C до приблизительно 39°C. Время культивирования может быть соответствующим образом определено специалистом в данной области путем мониторинга числа CD4/CD8DP–клеток и других клеток. Число дней культивирования для индуцирования CD4/CD8DP–клеток из гемопоэтических клеток–предшественников не имеет конкретных ограничений при условии, что могут быть получены CD4/CD8DP–клетки. Время культивирования составляет, предпочтительно, не менее, чем 10 дней (например, 12 дней, 14 дней, 16 дней, 18 дней, 20 дней или более), и не более, чем 60 дней. Как показано в описанных ниже примерах, в конкретном варианте осуществления изобретения, большое количество CD4/CD8DP–клеток может быть успешно получено путем культивирования в течение 21 дня – 28 дней.

[0034] В настоящем изобретении, полученные CD4/CD8DP–клетки могут быть выделены до их использования, либо они могут быть использованы в виде клеточной популяции, содержащей клетки другого типа (например, CD8SP–клетки). При выделении, клетки могут быть выделены с использованием молекул CD4, CD8, CD3, CD45 и т.п. в качестве индекса. В качестве метода выделения может быть применен метод, хорошо известный специалистам в данной области, и такими методами могут быть, например, метод меченая молекулой антитела в качестве индекса и метод с использованием вышеупомянутой проточной цитометрии или масс–цитометрии, метод магнитного разделения клеток или метод очистки с использованием аффинной колонки, на которой иммобилизуют нужный антиген, и т.п.

[0035] 2. Способ получения клеток, позитивных по одному CD8

CD8SP–клетки могут быть получены путем обработки CD4/CD8DP–клеток, полученных способом продуцирования согласно изобретению в стадии индуцирования дифференцировки в CD8SP–клетки (такой способ продуцирования CD8SP–клеток иногда сокращенно называется «способом продуцирования CD8SP–клеток согласно изобретению»). Способ продуцирования CD4/CD8DP–клеток описан в параграфе 1.

[0036] В качестве базальной среды и среды, используемой в способе продуцирования CD8SP–клеток согласно изобретению, могут быть использованы среды, аналогичные базальной среде и среде, описанной в параграфе 1.

[0037] Вышеупомянутая среда может содержать гормон коры надпочечников в качестве агента. Примерами гормонов коры надпочечников являются, например, глюкокортикоид и его производное. Примерами глюкокортикоидов являются, например, ацетат кортизона, гидрокортизон, ацетат флудрокортизона, преднизолон, тримацинолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон и дипропионат беклометазона. Из них предпочтительным является дексаметазон. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения, способ продуцирования клеток, позитивных по одному CD8, включает стадию индуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, с получением клеток, позитивных по одному CD8, путем культивирования указанных клеток, позитивных по двум CD4/CD8, в присутствии гормона коры надпочечников, а предпочтительно, дексаметазона.

[0038] При использовании дексаметазона в качестве гормона коры надпочечников, его концентрация в культуральной среде составляет, предпочтительно, 1 нМ – 100 нМ (например, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ), а особенно предпочтительно, 10 нМ.

[0039] Вышеупомянутая среда может содержать антитело (например, анти–CD3 антитело, анти–CD28 антитело, анти–CD2 антитело), цитокин (например, IL–7, IL–2, IL–15) и т.п.

[0040] Анти–CD3 антитело, используемое в настоящем изобретении, не имеет конкретных ограничений, при условии, что оно будет специфически распознавать CD3. Так, например, может быть использовано антитело, продуцированное из клона ОКТ3. Анти–CD3 антитело может быть связано с магнитными сферами и т.п., или вместо добавления вышеупомянутого анти–CD3 антитела к среде, может быть осуществлена стимуляция путем инкубирования Т–лимфоцитов в течение определенного периода времени в сосуде для культивирования, на поверхности которого находится связанное анти–CD3 антитело. Концентрация анти–CD3 антитела в среде, предпочтительно, составляет 10 нг/мл – 1000 нг/мл (например, 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл, 1000 нг/мл), а особенно предпочтительно, 500 нг/мл. Концентрация других антител может быть также соответствующим образом определена специалистом в данной области исходя из условий культивирования и т.п. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения, способ продуцирования клеток, позитивных по одному CD8, включает стадию

индуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, с получением клеток, позитивных по одному CD8, путем культивирования указанных клеток, позитивных по двум CD4/CD8, в присутствии анти-CD3 антитела.

[0041] Концентрация IL-2 в среде, используемой в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет 10 ед./мл – 1000 ед./мл (например, 10 ед./мл, 20 ед./мл, 30 ед./мл, 40 ед./мл, 50 ед./мл, 60 ед./мл, 70 ед./мл, 80 ед./мл, 90 ед./мл, 100 ед./мл, 500 ед./мл, 1000 ед./мл), а особенно предпочтительно, 100 ед./мл. Концентрация IL-7 или IL-15 в среде, используемой в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет 1 нг/мл – 100 нг/мл (например, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл), а особенно предпочтительно, 10 нг/мл. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения, способ продуцирования клеток, позитивных по одному CD8, включает стадию индуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, с получением клеток, позитивных по одному CD8, путем культивирования указанных клеток, позитивных по двум CD4/CD8, в присутствии цитокина, а предпочтительно, IL-2.

[0042] В способе продуцирования CD8SP-клеток согласно изобретению, температура культивирования CD4/CD8DP-клеток не имеет конкретных ограничений. Такая температура, предпочтительно, составляет, приблизительно от 37°C до приблизительно 42°C, а более предпочтительно, приблизительно от 37°C до приблизительно 39°C. Время культивирования может быть соответствующим образом определено специалистом в данной области путем мониторинга числа CD8-позитивных клеток и других клеток. Число дней культивирования не имеет конкретных ограничений при условии, что могут быть получены CD8SP-клетки. Время культивирования, предпочтительно, составляет не менее, чем 1 день, не менее, чем 3 дня, не менее, чем 7 дней, а, предпочтительно, не более, чем 60 дней.

[0043] CD8SP-клетки, полученные способом продуцирования согласно изобретению, не ограничиваются клетками, полученными путем дифференцировки из CD4/CD8DP-клеток (например, клеток, полученных как описано выше в параграфе 2). Следовательно, например, CD8SP-клетки, полученные без использования CD4/CD8DP-клеток, из клеток, выделенных как клетки, экспрессирующие один или более НРС-позитивных маркеров и/или не экспрессирующие один или более НРС-негативных маркеров согласно изобретению, из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники, также входят в объем CD8SP-клеток, полученных способом продуцирования согласно изобретению.

[0044] 3. Клеточная популяция, содержащая гемопоэтические клетки-предшественники, экспрессирующие один или более маркеров НРС.

Настоящее изобретение относится к клеточной популяции (далее сокращенно называемой «клеточной популяцией согласно изобретению»), содержащей большое количество гемопоэтических клеток-предшественников, экспрессирующих НРС-позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС-негативные

маркеры одного или более видов. Вышеупомянутая клеточная популяция может быть получена, например, путем выделения клеток, экспрессирующих НРС–позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС–негативные маркеры одного или более видов, из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, методом разделения, описанным выше. Определение маркера НРС, специфических молекул и гемопоэтических клеток–предшественников является таким, как оно описано выше.

[0045] Клеточная популяция согласно изобретению не имеет конкретных ограничений при условии, что она будет давать более высокое отношение гемопоэтических клеток–предшественников, экспрессирующих НРС–позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС–негативные маркеры одного или более видов (число гемопоэтических клеток–предшественников/общее число клеток, содержащихся в клеточной популяции), чем отношение, полученное стандартным методом (например, методом разделения с использованием CD34–позитивных, CD34–позитивных и CD43–позитивных, или CD43–позитивных и CD34–, CD31– или CD144–позитивных клеток в качестве индекса). Предпочтительно, чтобы такое количество составляло не менее, чем 40% (например, не менее, чем 50%, не менее, чем 60%, не менее, чем 70%, не менее, чем 80%, не менее, чем 90%, 100%). Клеточная популяция согласно изобретению может быть получена методом, описанным в стадии 1 способа продуцирования согласно изобретению. Число гемопоэтических клеток–предшественников, экспрессирующих НРС–позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС–негативные маркеры одного или более видов, может быть определено с помощью проточной цитометрии.

[0046] Как показано в Примерах, описанных ниже, клеточная популяция согласно изобретению обнаруживает высокую эффективность дифференцировки в CD4/CD8DP–клетки и CD8SP–клетки по сравнению с клеточной популяцией, которая не была подвергнута разделению клеток, экспрессирующих НРС–позитивные маркеры одного или более видов и/или не экспрессирующих НРС–негативные маркеры одного или более видов, а также превосходную способность к пролиферации.

[0047] 4. Реагент для разделения «клеточной популяции согласно изобретению»

Настоящее изобретение также относится к реагенту для разделения клеточной популяции согласно изобретению (далее сокращенно называемому «реагентом согласно изобретению»), где указанный реагент содержит антитело против маркера НРС согласно изобретению, а именно, против одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262, CD325, CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c, а предпочтительно, CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD49f, CD51 и CD102. Если реагент согласно изобретению содержит антитело против маркера НРС двух или более видов, то такой реагент может поставляться в виде набора реагентов, содержащего каждое антитело

в отдельном реагенте. Антитело, содержащееся в реагенте согласно изобретению, может быть получено в форме, например, антитела, связанного с флуоресцентным красителем, изотопом металла или сферой (например, магнитной сферой), в соответствии со способами разделения, применяемыми в стадии 1 способа продуцирования согласно изобретению.

[0048] Реагент согласно изобретению может также содержать анти-CD4 антитело и/или анти-CD8 антитело и, если это необходимо, антитела одного или более видов против других маркеров клеточной поверхности (например, CD3, CD45, CD235a, CD14, CD45, CD34, CD43), которые, как известно, экспрессируются и/или не экспрессируются в CD4/CD8DP-клетке и/или в CD8SP-клетке, и может быть использован как реагент для разделения CD4/CD8DP-клетки или CD8SP-клетки, индуцированной для дифференцировки из клеточной популяции согласно изобретению.

Кроме того, реагент согласно изобретению может также содержать реагенты (например, базальную среду, аддитивную среду и т.п.) для индуцирования дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников в CD4/CD8DP-клетку, а также в CD8SP-клетку. В качестве реагентов могут быть аналогичным образом использованы вещества, перечисленные в вышеупомянутом параграфе 1 и в вышеупомянутом параграфе 2.

[0049] Настоящее изобретение более подробно описано со ссылкой на примеры, которые приводятся лишь в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение объема изобретения.

[Примеры]

[0050] Пример 1 (Условия культивирования с использованием штамма ТКТ3V1-7)

В качестве клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники (далее иногда обозначаемые НРС), может быть использована неадгезивная клеточная популяция, полученная посредством дифференцировки iPS-клеток (штамма ТКТ3V1-7) в соответствии с известным методом (например, методами, описанными в Cell Reports 2(2012) 1722-1735 и WO 2017/221975). Для сообщения специфичности, штамм ТКТ3V1-7 высевали при 3×10^5 клеток/лунку в 6-луночный планшет, который подвергали обработке в условиях сверхнизкой адгезии (день 0) и культивировали в течение 5 дней в условиях низкой концентрации кислорода (5% O₂) в среде EB (в среде StemPro34, в которую добавляли 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферина, 5 нг/мл селенита натрия, 2 мМ L-глутамина, 45 мМ α-монотиоглицерина и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты) с добавлением 10 нг/мл BMP4, 5 нг/мл bFGF, 15 нг/мл VEGF, 2 мМ SB431542 (день 5). Затем последовательно добавляли 50 нг/мл SCF, 30 нг/мл TPO, 10 нг/мл Flt3L, и клетки снова культивировали в течение 5-9 дней (день -14) с получением популяции неадгезивных клеток. Во время культивирования, среду заменяли через каждые 2 или 3 дня. Вышеупомянутую популяцию неадгезивных клеток, содержащую НРС, окрашивали нижеследующей серией антител для каждой группы образцов.

[0051] [Таблица 1]

Группа образцов (серия антител)	Антитело	Производитель	Флуоресцентная молекула, связанная с антителом
1	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD62L антитело	Biolegend	PE
2	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD24 антитело	Biolegend	PE
3	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD90 антитело	Biolegend	PE
4	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD143 антитело	Biolegend	PE
5	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	BV510
	анти-CD45 антитело	Biolegend	APC/Cy7
	анти-CD14 антитело	Biolegend	FITC
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD218a антитело	eBioscience	APC
6	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7

	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD263 антитело	Biolegend	PE
7	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-Notch3 антитело	Biolegend	PE

[0052] После вышеупомянутого окрашивания, клеточные популяции подвергали сортированию с помощью FACS Aria. Клеточные фракции, полученные от каждой вышеупомянутой группы образцов, представлены ниже.

[0053] [Таблица 2]

Группа образцов	Полученная фракция клеток
1	Фракция А, фракция В и фракция С
2	Фракция D и фракция E
3	Фракция F и фракция G
4	Фракция H и фракция I
5	Фракция J и фракция K
6	Фракция L и фракция M
7	Фракция N и фракция O

[0054] В вышеупомянутой таблице, фракции А–G, соответственно, показаны ниже.

фракция А: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная

фракция В: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD62L–позитивная

фракция С: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD62L–негативная

фракция D: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD24–позитивная

фракция E: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD24–негативная

фракция F: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD90–позитивная

фракция G: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–

позитивная, CD90–негативная

фракция H: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD143–позитивная

фракция I: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD143–негативная

фракция J: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD218a–позитивная

фракция K: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD218a–негативная

фракция L: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD263–позитивная

фракция M: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD263–негативная

фракция N: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, Notch3–позитивная

фракция O: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, Notch3–негативная.

[0055] Клетки, содержащиеся в вышеупомянутых фракциях A–O, подвергали дифференцировке в лимфоидные клетки известным методом (например, методами, описанными в Journal of Leukocyte Biology 96(2016) 1165–1175 и WO 2017/221975). Для сообщения специфичности, каждую клеточную популяцию фракций A–O высевали при 2000 клеток/лунку в 48–луночный планшет, покрытый рекомбинантной химерой h–DLL4/Fc (Sino Biological) и ретронектином (Takara Bio Inc.), и культивировали в условиях при 5% CO₂, 37°C. Во время культивирования, среду заменяли через каждые 2 или 3 дня. В качестве среды использовали среду OP9 (содержащую 15% FBS, 2 мМL–глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 нг/мл стрептомицина, 55 мМ 2–меркаптоэтанол, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферина, 5 нг/мл селенита натрия) с добавлением 50 нг/мл SCF, 50 нг/мл IL–7, 50 нг/мл Flt3L, 100 нг/мл TPO, 15 мМ SB203580, 30 нг/мл SDF–1α. На день 7 и день 14 после начала культивирования, клетки пассировали в 48–луночный планшет с аналогичным покрытием. Все клетки выделяли на 21–й день после начала культивирования, подсчитывали на гемоцитометре и окрашивали нижеследующей серией антител.

[0056] [Таблица 3]

Серия антител	Производитель	Флуоресцентная молекула, связанная с антителом
анти–CD3 антитело	Biolegend	APC/Cy7
анти–CD45 антитело	Biolegend	Бриллиантовый фиолетовый 510
анти–TCRab антитело	eBioscience	FITC

анти-CD8b антитело	Beckman	PE
анти-CD7 антитело	Biolegend	APC
анти-CD5 антитело	eBioscience	PE/Cy7
анти-CD8a антитело	Biolegend	PerCP/Cy5.5
анти-CD4 антитело	Biolegend	BV421

[0057] Клеточные популяции, полученные после вышеупомянутого окрашивания, подвергали сортированию с помощью FACS Aria. Клеточные фракции, полученные путем вышеупомянутого окрашивания, представлены ниже. В настоящем описании, фракция лимфоцитов представляет собой фракцию, разделенную с использованием FSC (прямого рассеяния) и SSC (бокового рассеяния) и используемую в качестве индексов в методе, аналогичном методу, описанному в руководстве по цитометрии (Communications in Clinical Cytometry 18 (1994) 199–208).

Фракция P: фракция лимфоцитов

Фракция Q: фракция лимфоцитов, CD3–позитивная, CD45–позитивная, CD5–позитивная, CD7–позитивная

Фракция R: фракция лимфоцитов, CD3–позитивная, CD45–позитивная, CD7–позитивная, CD8a–позитивная, CD4–позитивная

Фракция S: фракция лимфоцитов, CD3–позитивная, CD45–позитивная, CD7–позитивная, CD8a–позитивная, CD4–негативная

[0058] Число клеток в каждом образце, взятом из фракций A–O на день 21 после начала культивирования (отношение к числу клеток образца, взятого из фракции A) представлено в Таблице 4.

[0059] [Таблица 4]

Фракция A	Фракция B	Фракция C	Фракция D	Фракция E	Фракция F	Фракция G	Фракция H	Фракция I	Фракция J	Фракция K	Фракция L	Фракция M	Фракция N	Фракция O
1	6,1	0,9	4,9	1	2,4	0,5	5,8	1	9,4	1,6	5,9	0,6	14	0,8

[0060] Из таблицы 4 видно, что клеточные популяции, содержащиеся в образцах, взятых из фракции B (CD62L–позитивной), фракции D (CD24–позитивной), фракции F (CD90–позитивной), фракции H (CD143–позитивной), фракции J (CD218a–позитивной), фракции L (CD263–позитивной) и фракции N (Notch3–позитивной), обладали большей способностью к пролиферации по сравнению с клеточной популяцией, содержащейся в образцах, взятых из фракции A.

[0061] Число клеток в клеточных фракциях P–S, полученных путем сортирования с помощью FACS Aria на 21–й день культивирования (отношение к числу клеток образца, взятого из фракции A), представлено в Таблице 5.

[0062] [Таблица 5]

	Фракция P	Фракция Q	Фракция R	Фракция S
--	-----------	-----------	-----------	-----------

Взяты из фракции А	1	1	1	1
Взяты из фракции F	4,2–7,9	19–62	26–222	23–69
Взяты из фракции Н	6,4–9,2	42–83	143–458	46–67
Взяты из фракции J	6,1–7,9	31–50	191–455	20–28

[0063] В результате было показано, что клеточная популяция, содержащая (а) CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD5–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–позитивные клетки или (b) CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD5–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–негативные клетки в высоком соотношении, может быть получена с использованием клеток, происходящих от фракции F, по сравнению с использованием клеток, происходящих от фракции G или фракции А. Аналогичным образом, было показано, что клеточная популяция, содержащая высокое соотношение (а) CD3–позитивных, CD45–позитивных, CD5–позитивных, CD7–позитивных, CD8a–позитивных, и CD4–позитивных клеток, или (b) клеточная популяция, содержащая высокое соотношение CD3–позитивных, CD45–позитивных, CD5–позитивных, CD7–позитивных, CD8a–позитивных и CD4–негативных клеток, может быть получена с использованием клеток, происходящих от фракции Н. Кроме того, было показано, что клеточная популяция, содержащая CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD5–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–позитивные клетки или CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD5–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–негативные клетки в высоком соотношении, может быть получена с использованием клеток, происходящих от фракции J, по сравнению с использованием клеток, происходящих от фракции К или фракции А. То есть, было показано, что клеточная популяция, содержащая клетки, позитивные по двум CD4/CD8 (или CD8–позитивные клетки) в высоком соотношении, может быть получена путем выделения клеток, экспрессирующих CD90, CD143 или CD218a в виде клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, и путем дифференцировки выделенных клеток.

[0064] Пример 2 (Условия культивирования с использованием штамма Ff–I01s04)

В качестве клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники (далее иногда обозначаемые НРС), была использована популяция неадгезивных клеток, полученная путем дифференцировки iPS–клеток (штамма Ff–I01s04) в соответствии с методами, описанными в Примере 1.

Клеточную популяцию, содержащую НРС, окрашивали серией антител 3, 4, 5 или 6 для каждой группы образцов, представленной в Примере 1 (соответственно, указанной как 3b, 4b, 5b, 6b в этом Примере) или серией антител 8b, указанной ниже.

[0065] [Таблица 6]

Группа образцов (серия антител)	Антитело	Производитель	Флуоресцентная молекула, связанная с антителом
------------------------------------	----------	---------------	--

3b	анти-CD34 антитело	Abcam	PE/Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD90 антитело	Biolegend	PE
8b	анти-CD34 антитело	Abcam	PE/Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	BV510
	анти-CD45 антитело	Biolegend	APC/Cy7
	анти-CD14 антитело	Biolegend	FITC
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD200 антитело	Biolegend	Бриллиантовый фиолетовый 421
4b	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD143 антитело	Biolegend	PE
5b	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	BV510
	анти-CD45 антитело	Biolegend	APC/Cy7
	анти-CD14 антитело	Biolegend	FITC
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD218a антитело	eBioscience	APC
6b	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD263 антитело	Biolegend	PE

[0066] После вышеупомянутого окрашивания, клеточные популяции подвергали сортированию с помощью FACS Aria. Клеточные фракции, полученные от каждой вышеупомянутой группы образцов, представлены ниже.

[0067] [Таблица 7]

Группа образцов	Полученная фракция клеток
3b	Фракция f и фракция g
8b	Фракция t и фракция u
4b	Фракция h и фракция i
5b	Фракция j и фракция k
6b	Фракция l и фракция m

[0068] В вышеуказанной Таблице показаны фракции f–m, t и u, соответственно:

фракция f: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD90–позитивная

фракция g: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD90–негативная

фракция h: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD143–позитивная

фракция i: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD143–негативная

фракция j: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD218a–позитивная

фракция k: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD218a–негативная

фракция l: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD263–позитивная

фракция m: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD263–негативная

фракция t: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD200–позитивная

фракция u: CD235a–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD200–негативная

[0069] Клетки, содержащиеся в вышеупомянутых фракциях f–m, t и u, подвергали дифференцировке в лимфоидные клетки методами, описанными в Примере 1. Все клетки выделяли на день 28 после начала культивирования и окрашивали нижеследующей серией антител.

[0070] [Таблица 8]

Серия антител	Производитель	Флуоресцентная молекула, связанная с антителом
CD3	Biolegend	APC/Cy7
CD45	Biolegend	Бриллиантовый фиолетовый 510
TCRab	eBioscience	FITC

CD8b	Beckman	PE
CD7	Biolegend	APC
CD5	eBioscience	PE/Cy7
CD8a	Biolegend	PerCP/Cy5.5
CD4	Biolegend	BV421

[0071] После вышеупомянутого окрашивания, клеточные популяции подвергали сортированию с помощью FACS Aria. Клеточные фракции, полученные от каждой вышеупомянутой группы образцов, представлены ниже:

фракция p: фракция лимфоцитов

фракция q: фракция лимфоцитов, CD45–позитивная, CD5–позитивная, CD7–позитивная

фракция g: фракция лимфоцитов, CD45–позитивная, CD7–позитивная, CD8a–позитивная, CD4–позитивная

фракция s: фракция лимфоцитов, CD45–позитивная, CD7–позитивная, CD8a–позитивная, CD4–негативная

[0072] Число клеток в каждом образце, взятом из фракций f–m, t и u на день 28 после начала культивирования (отношение к числу клеток в начале культивирования), представлено в Таблице 9.

[0073] [Таблица 9]

Фракция	Фракция	Фракция	Фракция	Фракция	Фракция	Фракция	Фракция	Фракция	Фракция
я	я	я	я	я	я	я	я	я	я
f	g	h	i	j	k	l	m	t	u
462,5	111,9	462,5	112,5	1125	50	1222,6	56,25	850	62,5

[0074] Из Таблицы 9 видно, что, по способности к пролиферации, фракция f превышает фракцию g, фракция h превышает фракцию i, фракция j превышает фракцию k, фракция l превышает фракцию m, а фракция t превышает фракцию u. То есть, было обнаружено, что клеточные популяции, содержащиеся в образцах, происходящих от CD90–позитивных, CD143–позитивных, CD218a–позитивных, CD263–позитивных или CD200–позитивных фракций, обладают большей способностью к пролиферации.

[0075] Число клеток в клеточных фракциях p–s, полученных путем сортирования с помощью FACS Aria на 28–й день культивирования клеток, содержащихся во фракциях f–m, t и u и засеянных при 1000 клеток/лунку, представлено в Таблице 10.

[0076] [Таблица 10]

	Фракция p	Фракция q	Фракция g	Фракция s
Взяты из фракции f	208125	139860	7553	40626
Взяты из фракции g	12085	0	0	0
Взяты из фракции h	151700	96801	18704	81257

Взяты из фракции i	11216	0	0	0
Взяты из фракции j	409500	322088	83093	228521
Взяты из фракции k	4430	0	0	0
Взяты из фракции l	419352	257113	22019	277591
Взяты из фракции m	8325	2683	159	3992
Взяты из фракции t	342550	262480	59781	125477
Взяты из фракции u	2569	0	0	0

[0077] FACS–анализ на день 28 культивирования клеток, представленных в Таблице 10, показал, что (a) CD45–позитивные, CD5–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные, и CD4–позитивные клетки или (b) CD45–позитивные, CD5–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–негативные клетки могут быть получены в высоком соотношении с использованием клеток, происходящих от каждой маркер–позитивной клетки, по сравнению с использованием клеток, происходящих от каждой маркер–негативной клетки.

Исходя из этих результатов было показано, что клеточная популяция, содержащая CD8–позитивные клетки (например, CD4/CD8DP–клетки, CD8SP–клетки) в высоком соотношении, может быть получена путем выделения клеток, экспрессирующих CD90, CD143, CD200, CD218a или CD263, в виде клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, и путем дифференцировки выделенных клеток.

[0078] Пример 3 (Условия культивирования с использованием штамма Ff–I01s04)

В качестве клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники (далее иногда обозначаемые НРС), была использована популяция неадгезивных клеток, полученная путем обработки iPS–клеток (штамма Ff–I01s04) в соответствии с методами, описанными в Примере 1. Вышеупомянутую популяцию неадгезивных клеток, содержащую НРС, окрашивали нижеследующей серией антител для каждой группы образцов.

[0079] [Таблица 11–1]

Группа образцов (серия антител)	Антитело	Производитель	Флуоресцентная молекула, связанная с антителом
1c	анти–CD34 антитело	Abcam	PE–Cy7
	анти–CD43 антитело	BD	APC
	анти–CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти–CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти–CD235a антитело	BD	FITC
	анти–CD7 антитело	Biolegend	PE

2c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD144 антитело	BD	BV421
3c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD56 антитело	Biolegend	PE
4c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD226 антитело	Biolegend	PE
5c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD262 антитело	Biolegend	PE
6c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD325 антитело	Biolegend	PE
7c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780

	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD49f антитело	Biolegend	PE
8c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD51 антитело	Biolegend	PE

[0080] [Таблица 11–2]

9c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD102 антитело	Biolegend	PE
10c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD42b антитело	Biolegend	PE
11c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD61 антитело	Biolegend	PE
12c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7
	анти-CD43 антитело	BD	APC
	анти-CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти-CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти-CD235a антитело	BD	FITC
	анти-CD62P антитело	Biolegend	PE
13c	анти-CD34 антитело	Abcam	PE-Cy7

	анти–CD43 антитело	BD	APC
	анти–CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти–CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти–CD235a антитело	BD	FITC
	анти–CD69 антитело	Biolegend	PE
14с	анти–CD34 антитело	Abcam	PE–Cy7
	анти–CD43 антитело	BD	APC
	анти–CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти–CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти–CD235a антитело	BD	FITC
	анти–CD102 антитело	Biolegend	PE
15с	анти–CD34 антитело	Abcam	PE–Cy7
	анти–CD43 антитело	BD	APC
	анти–CD45 антитело	Biolegend	BV510
	анти–CD14 антитело	Biolegend	APC/eFluor780
	анти–CD235a антитело	BD	FITC
	анти–CD156с антитело	Biolegend	PE

[0081] После вышеупомянутого окрашивания, клеточные популяции подвергали сортированию с помощью FACS Aria. Клеточные фракции, полученные от каждой вышеупомянутой группы образцов, представлены ниже.

[0082] [Таблица 12]

Группа образцов	Полученная фракция клеток
1с	фракция Ас и фракция Вс
2с	фракция Сс
3с	фракция Dс
4с	фракция Ес
5с	фракция Fс
6с	фракция Gс
7с	фракция Hс
8с	фракция Iс
9с	фракция Jс
10с	фракция Kс
11с	фракция Lс
12с	фракция Mс

13c	фракция Nc
14c	фракция Oc
15c	фракция Pc

[0083] В вышеуказанной таблице представлены нижеследующие фракции Ас–Рс, соответственно:

фракция Ас: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная

фракция Вс: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD7–позитивная

фракция Сс: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD144–позитивная

фракция Dc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD56–позитивная

фракция Ec: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD226–позитивная

фракция Fc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD262–позитивная

фракция Gc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD325–позитивная

фракция Hc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD49f–позитивная

фракция Ic: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD51–позитивная

фракция Jc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD102–позитивная

фракция Kc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD42b–позитивная

фракция Lc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD61–позитивная

фракция Mc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD62P–позитивная

фракция Nc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD69–позитивная

фракция Oc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD102–позитивная

фракция Pc: CD235а–негативная, CD14–негативная, CD34–позитивная, CD43–позитивная, CD156c–позитивная

[0084] Клетки, содержащиеся в вышеупомянутых фракциях Ас–Рс, подвергали дифференцировке в лимфоидные клетки методом, описанным в Примере 1. Все клетки

выделяли на 21–й день после начала культивирования, подсчитывали на гемоцитометре и окрашивали нижеследующей серией антител.

[0085][Таблица 13]

Серия антител	Производитель	Флуоресцентная молекула, связанная с антителом
анти–CD3 антитело	Biolegend	APC/Cy7
анти–CD45 антитело	Biolegend	Бриллиантовый фиолетовый 510
анти–TCRab антитело	eBioscience	FITC
анти–CD8b антитело	Beckman	PE
анти–CD7 антитело	Biolegend	APC
анти–CD5 антитело	eBioscience	PE/Cy7
анти–CD8a антитело	Biolegend	PerCP/Cy5.5
анти–CD4 антитело	Biolegend	BV421

[0086] После вышеуказанного окрашивания, клеточные популяции подвергали сортированию с помощью FACS Aria. Клеточные фракции, полученные от каждой вышеуказанной группы образцов, представлены ниже:

фракция Qc: фракция лимфоцитов

фракция Rc: фракция лимфоцитов, CD3–позитивная, CD45–позитивная, CD5–позитивная, CD7–позитивная

фракция Sc: фракция лимфоцитов, CD3–позитивная, CD45–позитивная, CD7–позитивная, CD8a–позитивная, CD4–позитивная

фракция Tc: фракция лимфоцитов, CD3–позитивная, CD45–позитивная, CD7–позитивная, CD8a–позитивная, CD4–негативная

[0087] Число клеток в каждом образце, взятом из фракций Ac–Pc на день 21 после начала культивирования (отношение к числу клеток в образце, взятом из фракции Ac), указано в Таблице 14.

[0088] [Таблица 14]

фракция Ac	фракция Bc	фракция Cc	Фракция Dc	Фракция Ec	Фракция Fc
1	3,1	3,5	1,2	2,0	3,9
фракция Gc	фракция Hc	Фракция Ic	Фракция Jc	Фракция Kc	Фракция Lc
1,8	0	0,2	1,0	0,7	0,5
фракция Mc	фракция Nc	фракция Oc	фракция Pc		
0	0,1	1,0	0,2		

[0089] Из Таблицы 14 видно, что все клеточные популяции, содержащиеся в образцах, взятых из фракции Bc (CD7–позитивной), фракции Cc (CD144–позитивной),

фракции Dc (CD56–позитивной), фракции Ec (CD226–позитивной), фракции Fc (CD262–позитивной) и фракции Gc (CD325–позитивной), обладают большей способностью к пролиферации по сравнению с клеточной популяцией в образце, взятом из фракции Ac. Кроме того, было обнаружено, что клеточные популяции, содержащиеся в образцах, взятых из фракции Hc (CD49f–позитивной), фракции Ic (CD51–позитивной), фракции Kc (CD42b–позитивной), фракции Lc (CD61–позитивной), фракции Mc (CD62P–позитивной), фракции Nc (CD69–позитивной) и фракции Pc (CD156c–позитивной), обладают меньшей способностью к пролиферации.

[0090] Число клеток в клеточных фракциях Qc–Tc, полученных путем сортировки с помощью FACS Aria на 21–й день культивирования (отношение к числу клеток в клеточных фракциях Qc–Tc в образце, взятом из фракции Ac), указано в Таблице 15.

[0091] [Таблица 15]

	фракция Qc	фракция Rc	фракция Sc	фракция Tc
Взяты из фракции Bc	3,3	3,7	3,1	2,6
Взяты из фракции Cc	3,8	4,3	7,0	2,4
Взяты из фракции Dc	1,3	1,4	2,2	0,9
Взяты из фракции Ec	0,9	1,0	1,7	0,7
Взяты из фракции Fc	4,1	4,7	6,5	2,9
Взяты из фракции Gc	2,1	2,4	3,1	1,7
Взяты из фракции Hc	0	0	0	0
Взяты из фракции Ic	0,2	0,1	0	0,2
Взяты из фракции Jc	1,2	0,7	0,3	0,6
Взяты из фракции Kc	0,8	0,7	0,3	0,8
Взяты из фракции Lc	0,3	0,3	0,5	0,3
Взяты из	0	0	0	0

фракции Mc				
Взяты из фракции Nc	0	0	0	0
Взяты из фракции Oc	1,2	0,7	0,3	0,6
Взяты из фракции Pc	0,1	0,1	0,1	0,1

[0092] В результате было показано, что клеточная популяция, содержащая CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные, CD4–позитивные клетки или CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–негативные клетки в высоком соотношении, может быть получена с использованием клеток, происходящих от фракции Bc, фракции Cc, фракции Dc, фракции Ec, фракции Fc или фракции Gc, но не с использованием клеток, происходящих от фракции Ac. Кроме того, было показано, что клеточная популяция, содержащая CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные, CD4–позитивные клетки или CD3–позитивные, CD45–позитивные, CD7–позитивные, CD8a–позитивные и CD4–негативные клетки в низком соотношении, может быть получена с использованием клеток, происходящих от фракции Nc, фракции Ic, фракции Jc, фракции Kc, фракции Lc, фракции Mc, фракции Nc, фракции Oc или фракции Pc, но не с использованием клеток, происходящих от фракции Ac. То есть, было показано, что клеточная популяция, содержащая клетки, позитивные по двум CD4/CD8 (или клетки, позитивные по одному CD8) в высоком соотношении, может быть получена путем выделения клеток, экспрессирующих один или более из CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, или клеток, не экспрессирующих один или более из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156с, в виде клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, и путем дифференцировки выделенных клеток.

[0093] Эта заявка основана на патентной заявке No. 2017–087723, поданной в Японии (дата подачи: 26 апреля, 2017), содержание которой включено в настоящее изобретение в полном объеме.

[Промышленное применение]

[0094] Настоящее изобретение позволяет получить более незрелые Т–клетки и зрелые Т–клетки и/или получить эти клетки в более высоких концентрациях. Полученные таким образом клетки могут быть использованы для профилактики или лечения заболеваний, таких как опухоль, инфекция, аутоиммунное расстройство и т.п.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, где указанный способ включает следующие стадии:

стадию 1: выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156с, и

стадию 2: дифференцировки клеток, выделенных в стадии 1, в клетки, позитивные по двум CD4/CD8.

2. Способ по п. 1, где клетки, отобранные в указанной стадии 1, не экспрессируют CD235a или CD14, но экспрессируют CD45, CD34 и CD43.

3. Способ по п. 1 или 2, где указанная стадия 1 включает выделение из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325.

4. Способ по п. 3, где первая группа в указанной стадии 1 состоит из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD7 и CD144.

5. Способ по п. 1 или 2, где указанная стадия 1 включает выделение из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156с.

6. Способ по п. 5, где вторая группа в указанной стадии 1 состоит из CD49f, CD51 и CD102.

7. Способ по любому из п.п. 1–6, где клеточную популяцию, содержащую гемопоэтические клетки–предшественники в указанной стадии 1, получают путем индуцирования дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

8. Способ по п. 7, где указанными плюрипотентными стволовыми клетками являются человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

9. Способ получения клеток, позитивных по одному CD8, включающий стадию индуцирования клеток, позитивных по двум CD4/CD8, и полученных способом по любому из п.п. 1–8, в клетки, позитивные по одному CD8.

10. Способ по п. 9, где указанные клетки, позитивные по одному CD8, представляют собой цитотоксические Т–лимфоциты.

11. Клеточная популяция, полученная путем выделения из клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки–предшественники, клеток, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24,

CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или клеток, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c.

12. Клеточная популяция по п. 11, где выделенная клетка не экспрессирует CD235a или CD14, но экспрессирует CD45, CD34 и CD43.

13. Клеточная популяция по п. 11 или 12, где указанную клеточную популяцию, содержащую гемопоэтические клетки–предшественники, получают путем индуцирования дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

14. Клеточная популяция по п. 13, где указанными плюрипотентными стволовыми клетками являются человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

15. Клеточная популяция, содержащая гемопоэтические клетки–предшественники, экспрессирующие молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262 и CD325, и/или гемопоэтические клетки–предшественники, не экспрессирующие молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c, в отношении [число гемопоэтических клеток–предшественников/общее число клеток в клеточной популяции] не менее, чем 40%.

16. Клеточная популяция по п. 15, где отношением является отношение гемопоэтических клеток–предшественников, экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из первой группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD200, CD218a, CD7 и CD144.

17. Клеточная популяция по п. 15, где отношением является отношение гемопоэтических клеток–предшественников, не экспрессирующих молекулы одного или более видов, выбранные из второй группы, состоящей из CD49f, CD51 и CD102.

18. Реагент для разделения гемопоэтических клеток–предшественников, где указанный реагент включает антитело против каждой из молекул одного или более видов, выбранных из группы, состоящей из CD24, CD62L, CD90, CD143, CD263, Notch3, CD32, CD39, CD49a, CD164, CD317, CD200, CD218a, CD7, CD144, CD56, CD226, CD262, CD325, CD49f, CD51, CD102, CD42b, CD61, CD62P, CD69, CD102 и CD156c.

19. Реагент по п. 18, также включающий антитела одного или более видов против CD235a, CD14, CD45, CD34 и/или CD43.

По доверенности