

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 795**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/0797** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2017** **PCT/GB2017/052707**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018** **WO18051092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2017** **E 17771536 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021** **EP 3513191**

54 Título: **Identificación y aislamiento de progenitores óticos humanos**

30 Prioridad:

**15.09.2016 GB 201615714**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.11.2021**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF SHEFFIELD (100.0%)**  
**Firth Court Western Bank**  
**Sheffield S10 2TN, GB**

72 Inventor/es:

**RIVOLTA, CARLOS MARCELO NICOLAS y**  
**BODDY, SARAH LOUISE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 877 795 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Identificación y aislamiento de progenitores óticos humanos

- 5 La presente invención se refiere generalmente a la identificación y aislamiento de células progenitoras óticas humanas. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de uso de marcadores celulares para identificar y aislar células progenitoras óticas humanas de una población mixta de células, métodos de enriquecimiento y producción de células progenitoras óticas humanas y kits asociados para su uso en identificación y/o aislamiento.
- 10 La sordera es una condición con una alta prevalencia en todo el mundo, producida principalmente por la pérdida de las células ciliadas sensoriales y sus neuronas ganglionares espirales asociadas (SGN). De todas las formas de sordera, la neuropatía auditiva es de particular interés. Esta condición, definida principalmente por el daño a las SGN con relativa preservación de las células ciliadas, es responsable de una proporción sustancial de pacientes con discapacidad auditiva. Aunque la pérdida de células ciliadas puede evitarse parcialmente con un implante coclear, no se dispone de un
- 15 tratamiento de rutina para la pérdida de neuronas sensoriales, ya que una innervación deficiente limita el rendimiento prospectivo de un implante. El uso de células madre para recuperar los circuitos sensoriales dañados es una estrategia terapéutica potencial.
- 20 Se han desarrollado protocolos para inducir la diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESC) mediante el uso de señales, como FGF3 y FGF10, involucradas en la especificación inicial de la placa ótica (Chen y otros, 2012. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. Nature, 490(7419):278-82. doi: 10.1038/nature11415). Los progenitores óticos inducidos son capaces de diferenciarse *in vitro* en células similares a células ciliadas y neuronas auditivas que muestran las propiedades electrofisiológicas esperadas. Además, cuando se trasplantan a un modelo de neuropatía auditiva, los neuroprogenitores óticos se injertan, diferencian y mejoran
- 25 significativamente los umbrales de respuesta evocados auditivos. Sin embargo, el método de inducción de FGF3/10 usado es ineficiente y produce aproximadamente el 20 % de los tipos de células requeridos únicamente.
- Si los progenitores óticos derivados de células madre embrionarias humanas (hESC) se van a usar en un entorno clínico, es esencial que esas células puedan aislarse de otros tipos de células producidas inadvertidamente durante el proceso
- 30 de diferenciación. Un método establecido para separar las poblaciones de células componentes de los cultivos heterogéneos es la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), pero para usar este método, deben identificarse marcadores específicos de la superficie celular que se unan al tipo de célula clave, por ejemplo, los progenitores óticos. Aunque se ha descrito una variedad de marcadores para aislar progenitores neurales genéricos, no se ha identificado ninguno para aislar progenitores óticos humanos (neurales o epiteliales).
- 35 Boddy y otros, (Regenerative Med. (2012) vol 7, no 6, págs. 757-767) y Boddy y otros, (Human Gene Therapy (2013), vol 24, no. 5) describen la generación *in vitro* de células progenitoras del oído interno a partir de células madre mesenquimales de médula ósea humana y la generación de linajes óticos a partir de células madre pluripotentes inducidas por humanos, respectivamente.
- 40 Un objetivo de la presente invención es para proporcionar un método para identificar y potencialmente aislar progenitores óticos humanos de poblaciones mixtas de células.
- Resumen de la invención
- 45 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de identificación de células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células que comprende determinar si una célula tiene al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1 (también conocido como CD15 o Lewis x), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141.
- 50 En una modalidad, los marcadores celulares SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 son marcadores celulares positivos; y/o el marcador celular CD 141 es un marcador celular negativo.
- En una modalidad, se usan al menos dos marcadores celulares positivos en combinación para identificar progenitores óticos humanos; o se usan al menos tres, cuatro o cinco marcadores celulares positivos en combinación para identificar progenitores óticos humanos; o un marcador celular positivo, o al menos dos marcadores celulares positivos se usan en combinación con el marcador celular negativo CD141.
- 55 En una modalidad, la población mixta de células se proporciona a partir de, o durante, un protocolo de diferenciación de células madre pluripotentes *in vitro*, opcionalmente en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPSC); o en donde la población mixta de células se proporciona a partir de, o durante, procedimientos de dediferenciación, transdiferenciación o reprogramación directa en linajes de células óticas humanas; o en donde la población mixta de células se proporciona a partir de tejido, opcionalmente en donde las células son muestras cocleares o vestibulares obtenidas de intervenciones quirúrgicas de oídos internos adultos.
- 60

En una modalidad, la población mixta de células se pone en contacto con uno o más miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares, opcionalmente en donde el miembro de unión comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o una mímica del mismo.

5 En una modalidad, el método comprende una etapa de detección, en donde los marcadores celulares se detectan como presentes o no presentes en una célula o grupo de células, opcionalmente en donde la detección comprende el uso de FACS y/o el uso de MACS.

10 En una modalidad, el miembro de unión se etiqueta para su identificación, opcionalmente en donde la etiqueta comprende un fluoróforo. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de identificación de células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células mediante el uso de al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1 (también conocido como CD15), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141, el método que comprende:

- 15
- proporcionar miembros de unión específicos para al menos dos marcadores celulares diferentes;
  - poner en contacto la población mixta de células con los miembros de unión; y
  - detectar la unión o no unión de los miembros de unión a células en la población mixta de células.

20 En una modalidad, el método comprende además la determinación de que una célula es una célula progenitora ótica humana si:

- 20
- a) los miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares positivos se unen al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
  - b) un miembro de unión dispuesto para unirse a uno de los marcadores celulares positivos se une al menos a uno de los marcadores celulares positivos en la célula, y un marcador de unión dispuesto para unirse al marcador celular negativo CD141 no se une a la célula,

25 opcionalmente en donde el método comprende la determinación de que una célula es una célula progenitora ótica humana si:

- 30
- i) los miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares positivos se unen al menos a tres marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
  - ii) los miembros de unión dispuestos para unirse al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes se unen al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes en la célula, y un marcador de unión dispuesto para unirse al marcador celular negativo CD141 no se une a la célula.

35 En una modalidad, se proporciona un método para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células que comprende determinar si una célula tiene al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados entre SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141, en donde las células identificadas tienen:

- 40
- a) al menos dos de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 o GD2; o
  - b) al menos uno de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y no CD141,
- se identifican como células progenitoras óticas humanas.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de enriquecimiento de células progenitoras óticas humanas a partir de una población mixta de células, el método comprende:

- 45
- identificar las células progenitoras óticas humanas de acuerdo con la invención en la presente descripción; y
  - clasificar las células de manera que las células progenitoras óticas humanas se aislen de las células progenitoras no óticas, de manera que las células progenitoras óticas humanas se enriquezcan en la población.

En una modalidad, la clasificación comprende FACS y/o comprende MACS.

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de producción de una población de células progenitoras óticas humanas, el método comprende:

- 55
- diferenciar células progenitoras no óticas en células progenitoras óticas humanas, de manera que algunas células progenitoras no óticas pueden permanecer en la población para formar una población mixta de células; y
  - enriquecer las células progenitoras óticas humanas de la población mixta de células de acuerdo con el método de enriquecimiento de células progenitoras óticas humanas de la invención en la presente descripción.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende al menos dos miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados entre SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

60 En una modalidad, el kit comprende al menos tres miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

En una modalidad, el kit comprende un panel de miembros de unión, en donde el panel de miembros de unión comprende un miembro de unión específico para cada uno de los marcadores celulares de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

- 5 En una modalidad, los miembros de unión son anticuerpos, opcionalmente en donde los anticuerpos están etiquetados. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de CD141 como marcador celular negativo para identificar células progenitoras no óticas en una población mixta de células.

10 Ventajosamente, los marcadores celulares SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141 se han identificado a través de múltiples rondas de cribado mediante el uso de un panel de anticuerpos de superficie celular en dos líneas de células madre embrionarias humanas diferentes, diferenciadas en progenitores óticos mediante el uso de dos diferentes métodos. Mediante el uso de umbrales de expresión objetivos y cuantitativos y análisis morfológico cualitativo de la morfología del progenitor ótico, se seleccionaron los siguientes marcadores que etiquetaron el tipo de célula correcto. Además, CD141 se identificó como un marcador negativo, es decir, etiqueta células que no son progenitoras óticas. El proteoma de la superficie celular de progenitores óticos derivados de células madre pluripotentes humanas se ha caracterizado mediante el uso de anticuerpos que se pueden emplear en citometría de flujo y clasificación celular fluorescente automatizada (FACS) para purificarlos de las poblaciones heterógenas generadas a partir de células madre pluripotentes diferenciadas. El aislamiento y la purificación puede a) mejorar la aplicación directa para la terapia celular, al definir mejor el tipo de célula apropiado y retirar las células potencialmente peligrosas y b) mejorar los ensayos *in vitro* de detección de fármacos y toxicidad mediante la eliminación de células que podrían tener un efecto de confusión. Además, estos marcadores deberían ser muy útiles para purificar los progenitores óticos con el fin de: 1) Hacer que se diferencien aún más en células ciliadas sensoriales o neuronas. Esto debería hacer que los protocolos de diferenciación sean más eficientes, facilitando la ampliación de los preparativos para los exámenes de detección de drogas de alto rendimiento; y 2) Seleccionar el tipo de célula apropiado para la terapia de trasplante de células, minimizando la contaminación con tipos de células no deseadas y reduciendo los riesgos potenciales de la terapia de desarrollar efectos secundarios.

Breve descripción de los dibujos:

30 Figura 1 - La inducción de células hES hacia un destino de progenitor ótico se logra mediante la inducción de la señalización por FGF con FGF3 y FGF10. Se ha logrado un rendimiento mejorado de progenitores mediante la adición de la inactivación de WNT durante los primeros 9 días, seguida de la activación de WNT durante 3 días con una reducción simultánea de la concentración de FGF3 y FGF10.

35 Figura 2 - Gráficos de puntos generados a partir de las intensidades de fluorescencia de las células individuales (datos de la placa 1), los niveles de GFP del reportero endógeno en el eje xy Alexa 568 de los anticuerpos marcadores de superficie celular dirigidos a los secundarios en el eje y.

40 Figura 3 - Imágenes de GD3 (rojo), PAX2 (verde) y Hoechst (azul) fusionadas. Las flechas indican: Colonia PAX2+/GD3- de morfología progenitora neuronal ótica, colonia PAX2+/GD3+ de progenitores epiteliales óticos y células PAX2-/GD3+ que no se prevé que sean progenitores óticos según la morfología.

Figura 4a - Los pozos resaltados no se considerarán impactos potenciales, es decir, más abajo del umbral.

45 Figura 4b - Los pozos resaltados no se considerarán impactos potenciales, es decir, por encima del umbral.

Figura 4c - El anticuerpo correspondiente al pocillo F-3 solo se unió a células de la línea H14s9 que habían sido tratadas con IWR-1 y BIO. Como no es común tanto a las líneas como a los protocolos, no se le considera más como un candidato.

50 Figura 5 - Porcentajes de los marcadores seleccionados detectados en el cribado BD Lyoplate. SSEA1 se representó dos veces (como el anticuerpo HI98, etiquetado como CD15, y como el anticuerpo MC480, etiquetado como SSEA1). GD3 y TRA-2-49/6E no estaban representados en las BD Lyoplates y solo se seleccionaron de nuestro pequeño panel inicial.

55 Figura 6 - Sección de un conducto coclear humano de 13 semanas, teñido para CD141. Las células CD141 positivas (flecha) están ubicadas fuera del epitelio que contiene progenitores óticos (punta de flecha).

Figura 7 - Sección de un conducto coclear de 8 semanas, que muestra tinción para CD141 y neurofilamento (NF200). CD141 etiqueta las células que rodean el epitelio coclear, pero excluye los neuroblastos positivos a NF200 (puntas de flecha en la sección teñida con NF200, flechas en la sección teñida con CD141).

60 Figura 8a y 8b - hESC diferenciadas en progenitores óticos y teñidas para SSEA4, Tra-2-49 y CD141. (A) y (B) muestran dos experimentos independientes. SSEA4 y TRA-2-49 se colocan en la misma población celular (columna izquierda) ((A) P3-Q2 55,86 %; (B) P3-Q2 65,15 %), mientras que la mayoría de las células positivas para SSEA4/TRA-2-49 son CD141 negativo ((A) P4-Q3 48,97 %, P5-Q1 52,87 %; (B) P4-Q3 65,82 %, P5-Q1 66,79 %). (A) y (B) muestran los ejemplos más extremos, con células positivas para CD141 que varían de ~0,3 a ~8 % ((A) P4-Q2 8,17 %, P5-Q2 8,25 %; (B) P4-Q2 0,39 %, P5-Q2 0,49 %).

Figura 9 - Las hESC se diferenciaron en progenitores óticos durante 14 días y se clasificaron para SSEA4/TRA2-49. Luego, se permitió que las células dobles positivas se diferenciaron durante 17, 20 y 26 días en células similares a células ciliadas, mediante el uso de un sistema de cultivo de organoide (3D) desarrollado en nuestro laboratorio. La diferenciación en células similares a células ciliadas también podría lograrse mediante el uso de un método publicado (por ejemplo, Koehler y otros, 2017). Las células no clasificadas también se diferenciaron para compararlas y las muestras se analizaron mediante qPCR. Los marcadores de células ciliadas Myo7a y Atoh1 se regularon positivamente en la población clasificada, después de 26 días de cultivo 3D. LGR5, una célula madre y un marcador de células de soporte se regularon positivamente en los progenitores inmaduros antes de la clasificación y durante las primeras etapas de diferenciación, principalmente en las muestras de células no clasificadas. JAG1, un marcador celular de soporte, no se reguló positivamente.

#### Descripción detallada

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células mediante el uso de al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1 (también conocido como CD15 o Lewis x), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células que comprende determinar si una célula tiene al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células que comprende determinar si una célula tiene al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141, en donde las células identificadas tienen:

- a) al menos dos de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 o GD2; o
  - b) al menos uno de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y no CD141,
- se identifican como células progenitoras óticas humanas.

En una modalidad, los marcadores celulares SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 son marcadores celulares positivos y CD141 es un marcador celular negativo. Adecuadamente, los métodos implican medir los marcadores celulares positivos. Adecuadamente, los métodos implican medir los marcadores celulares negativos. Los métodos también pueden implicar la medición de marcadores celulares positivos y negativos.

Mediante el uso de marcadores de superficie celular como se describió en la presente descripción puede comprender su uso en una etapa de identificación/determinación. En particular, la determinación de si el marcador de superficie celular está presente o no está presente en una célula, o si está presente o no está presente en un grupo de células. Los marcadores de células positivas pueden usarse en combinación entre sí para identificar progenitores óticos humanos, por ejemplo, al menos en pares de marcadores positivos (es decir, dos o más de los marcadores positivos). En otra modalidad, al menos tres de los marcadores celulares positivos se usan en combinación. En otra modalidad, al menos cuatro de los marcadores celulares positivos se usan en combinación. En otra modalidad, los cinco (es decir, cinco de los) marcadores celulares positivos de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 se usan para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células.

Los marcadores celulares positivos también se pueden usar en combinación con el marcador celular negativo CD141. En una modalidad, al menos uno (es decir, uno de los) marcadores celulares positivos seleccionado de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 se usa en combinación con el marcador celular negativo CD141. En otra modalidad, al menos dos (es decir, dos de los) marcadores celulares positivos seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 se usan en combinación con el marcador celular negativo CD141. En otra modalidad, se usan al menos tres (es decir, tres de los) marcadores celulares positivos seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 en combinación con el marcador celular negativo CD141. En otra modalidad se usan al menos cuatro (es decir, cuatro de los) marcadores celulares positivos seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 en combinación con el marcador celular negativo CD141. En otra modalidad, los cinco (es decir, cinco de los) marcadores celulares positivos de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 se usan en combinación con el marcador celular negativo CD141.

El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares SSEA1 y GD3. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos SSEA1 y GD3, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende los al menos dos marcadores celulares SSEA1 y TRA-2-49. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos SSEA1 y TRA-2-49, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares SSEA1 y SSEA4. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos SSEA1 y SSEA4, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares SSEA1 y GD2. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos

5 marcadores celulares positivos SSEA1 y GD2, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares GD3 y TRA-2-49. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos GD3 y TRA-2-49, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende los al menos dos marcadores celulares GD3 y SSEA4. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos GD3 y SSEA4, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares GD3 y GD2. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos GD3 y GD2, y el marcador celular negativo CD141.

10 El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares TRA-2-49 y SSEA4. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos TRA-2-49 y SSEA4, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares TRA-2-49 y GD2. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos TRA-2-49 y GD2, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, que comprende al menos dos marcadores celulares SSEA4 y GD2. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, que comprende al menos dos marcadores celulares positivos SSEA4 y GD2, y el marcador celular negativo CD141.

15 El uso de marcadores celulares en combinación puede ser simultáneo (sustancialmente al mismo tiempo) o secuencialmente (en diferentes momentos/etapas) en la identificación. En una modalidad, el uso de marcadores celulares en combinación es simultáneo, por ejemplo, en FACS y/o MACS.

20 La población mixta de células puede denominarse de cualquier otra manera una población celular heterogénea. La población mixta de células puede ser *in vitro*. Los métodos de la invención se realizan *in vitro*. En una modalidad, la población mixta de células se puede proporcionar a partir de, o durante, un protocolo de diferenciación de células madre *in vitro* (como células madre pluripotentes como iPSC). En otra modalidad, la población mixta de células puede proporcionarse a partir de, o durante, procedimientos de desdiferenciación, transdiferenciación o reprogramación directa en linajes de células óticas humanas.

25 En otra modalidad, la población mixta de células se puede proporcionar a partir de tejido, por ejemplo, de una biopsia. Las fuentes de células progenitoras óticas humanas pueden ser cualquier tejido conocido por un experto en la técnica, incluidos, entre otros, tejidos en desarrollo del oído interno del feto y muestras cocleares y vestibulares obtenidas de intervenciones quirúrgicas de oídos internos de adultos.

30 La población mixta de células puede ser de mamífero. En una modalidad, las células de la población mixta de células son humanas.

35 El método de identificación puede comprender dirigir los marcadores celulares con un miembro de unión que sea capaz de detectar, por ejemplo, la unión del miembro de unión al marcador celular puede ser detectable. La población mixta de células puede ponerse en contacto con uno o más miembros de unión capaces de unirse (alternativamente dispuestos para unirse) a los marcadores celulares.

40 El miembro de unión puede unirse preferentemente a un marcador celular descrito en la presente descripción o ser específico de cualquier otra manera para un marcador celular descrito en la presente descripción. El miembro de unión puede comprender un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o un mimético del mismo.

45 En una modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA1 comprende el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo HI98 o 480-1-1.

50 En una modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA4 comprende el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo MC-813-70.

- En una modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a TRA-2-49 comprende el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo TRA-2-49/6E.
- En una modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD2 comprende uno cualquiera de los anticuerpos 14,18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD2 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con cualquiera de los anticuerpos 14,18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD2 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos 14,18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD2 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que cualquiera de los anticuerpos 14,18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD2 puede comprender un anticuerpo que tiene los mismos CDR que cualquiera de los anticuerpos 14,18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22.
- En una modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD3 comprende el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD3 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD3 puede comprender un miembro de unión, como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD3 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a GD3 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo DMab-7 o VINIS56.
- En una modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a CD141 comprende el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a CD141 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a CD141 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a CD141 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión para identificar/unirse a CD141 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo 1A4.
- SSEA4 (Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S-i, Andrews PW, Knowles BB, Solter D. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. EMBO J. 1983 ;2:2355-2361.)
- GD2 (Andrews PW, Nudelman E, Hakomori Si, Fenderson BA. Different patterns of glycolipid antigens are expressed following differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid, hexamethylene bisacetamide (HMBA) or bromodeoxyuridine (BUdR) Differentiation. 1990;43:131-138) y (Durbas M, Horwacik I, Boratyn E, Kamycka E, Rokita H, GD2 ganglioside specific antibody treatment downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling network in human neuroblastoma cell lines. Int J Oncol. 2015 Sep;47(3): 1143-59. doi: 10.3892/ijo.2015.3070.)
- SSEA1 (Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA1) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978;75:5565-5569.)
- GD3 (Andrews PW, Nudelman E, Hakomori Si, Fenderson BA. Different patterns of glycolipid antigens are expressed following differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid, hexamethylene bisacetamide (HMBA) or bromodeoxyuridine (BUdR) Differentiation. 1990;43:131-138) y (Stuhlmiller GM1, Roberson KM, Seigler HF., Serological response of non-human primates to human melanoma disialoganglioside GD3. Cancer Immunol Immunother. 1989;29(3):205 -1 0)
- TRA-2-49 (Andrews PW1, Casper J, Damjanov I, Duggan-Keen M, Giwerzman A, Hata J, von Keitz A, Looijenga LH, Millán JL, Oosterhuis JW, Pera M, Sawada M, Schmoll HJ, Skakkebaek NE, van Putten W, Stern P, Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. Int J Cancer. 1996 Jun 11;66(6):806-16.)
- CD141 (Mutin M, Dignat-George F, Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. Tissue Antigens. 1997 Nov;50(5):449-58.)
- El término "anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, ya sea natural o producido parcialmente o totalmente de forma

sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión de anticuerpo. Estos pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse parcialmente o totalmente de forma sintética. Ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subclases isotípicas; fragmentos que comprenden un dominio de unión a antígeno tal como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal puede denominarse "mAb".

Como los anticuerpos pueden modificarse de varias formas, el término "anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier miembro o sustancia de unión específica que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales, miméticos y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintética. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. Un mimético de anticuerpo puede comprender un affibody.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unión a los antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste de dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb el cual consiste de un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F (ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; y (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno.

El método de la invención puede comprender una etapa de detección, en donde los marcadores celulares se detectan como presentes o no presentes en una célula o grupo de células.

El experto en la materia comprenderá que existen varios métodos para detectar la unión de miembros de unión, tales como anticuerpos, a un marcador de superficie celular. Tal método puede comprender etiquetar el miembro de unión con una etiqueta/etiqueta secuencial detectable o mediante el uso de un miembro de unión secundario, como un anticuerpo, que está etiquetado o etiquetado con una secuencia y es capaz de unirse específicamente al miembro de unión "primario" unido al marcador celular.

En una modalidad, el miembro de unión está etiquetado (o etiquetado con una secuencia de cualquier otra manera) para su identificación. Una vez que un miembro de unión etiquetado se une al marcador celular, la célula puede denominarse "célula etiquetada". Puede usarse una etiqueta diferente para etiquetar cada especie de miembro de unión dispuesto para unirse a un marcador celular. La etiqueta puede comprender cualquiera de una etiqueta radiactiva, una etiqueta enzimática, una etiqueta magnética, una etiqueta de afinidad (como biotina o avidina) o una etiqueta detectable por emisión de luz, como un fluoróforo o cromóforo; o sus combinaciones. La etiqueta puede conjugarse con el miembro de unión, por ejemplo mediante enlace covalente.

El fluoróforo puede estar en forma de proteínas fluorescentes, como GFP (verde), YFP (amarillo) o RFP (rojo). Alternativamente, el fluoróforo puede ser un fluoróforo orgánico no proteico. Los fluoróforos que se pueden proporcionar como etiquetas pueden comprender cualquiera del grupo seleccionado de derivados de xanteno, tales como fluoresceína, rodamina, verde de Oregon, eosina y rojo de Texas; Derivados de cianina, tales como cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina y merocianina; derivados de la escuaraina y escuarainas de anillo sustituido, incluidos los colorantes Seta, SeTau y Square; derivados de naftaleno (derivados de dansilo y prodan); derivados cumarínicos; derivados de oxadiazol, tales como piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y benzoxadiazol; derivados de antraceno, tales como antraquinonas, incluyendo DRAQ5, DRAQ7 y CyTRAK Orange; derivados de pireno, como azul cascada; derivados de oxazina, como rojo Nilo, azul Nilo, violeta de cresilo y oxazina 170; derivados de acridina, tales como proflavina, naranja de acridina, amarillo de acridina; derivados de arilmetina, tales como auramina, violeta cristal, verde malaquita; y derivados de tetrapirrol, tales como porfinas, ftalocianina y bilirrubina.

Puede usarse un fluoróforo diferente para etiquetar cada especie de miembro de unión dispuesto para unirse a un marcador celular. Cada fluoróforo tiene un pico característico de excitación y longitud de onda de emisión que puede detectarse. Se pueden usar puntos cuánticos en lugar de los fluoróforos tradicionales.

Los aptámeros, secuencias cortas de nucleótidos que pueden reconocer dominios de proteínas específicos, pueden proporcionar un miembro de unión alternativo a los anticuerpos. Debido a que los aptámeros son pequeños y cambian de conformación tras la unión de su objetivo, se pueden diseñar para que la unión específica libere un bloqueador o genere un par FRET que pueda detectarse.

La detección de células etiquetadas puede ser mediante cualquier ensayo adecuado, que puede comprender el uso de cualquiera del grupo que comprende inmunoensayos, espectrometría, transferencia Western, ELISA, inmunoprecipitación, ensayo de ranura o transferencia por puntos, enfoque isoelectrico, SDS-PAGE y tinción inmunohistológica de micromatrices de anticuerpos, radioinmunoensayo (RIA), fluoroinmunoensayo, un inmunoensayo mediante el uso de un sistema avidina-biotina o estreptavidina-biotina, etc. o sus combinaciones. Estos métodos se

conocen bien por los expertos en la técnica. Algunos métodos de detección pueden requerir la destrucción de las células. En algunas modalidades, el método de detección puede no ser destructivo para la célula. Por ejemplo, la detección puede comprender microscopía, como microscopía confocal y/o de fluorescencia, para identificar células etiquetadas. La detección puede comprender el uso de FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) o MACS (clasificación de células activadas magnéticamente). En una modalidad, la detección comprende el uso de FACS.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células mediante el uso de al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1 (también conocido como CD15), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141, que comprende el método:

- que proporciona miembros de unión específicos para al menos dos marcadores celulares diferentes (es decir, en donde los marcadores celulares se seleccionan de SSEA1 (también conocido como CD15), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141);
- poner en contacto la población mixta de células con los miembros de unión; y
- detectar la unión o no unión de los miembros de unión a células en la población mixta de células.

El método puede comprender además la determinación de que una célula es una célula progenitora ótica humana si:

- a) los miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares positivos se unen al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
- b) un miembro de unión dispuesto para unirse a uno de los marcadores celulares positivos se une al menos a uno de los marcadores celulares positivos en la célula, y un marcador de unión dispuesto para unirse al marcador celular negativo CD141 no se une a la célula.

En otra modalidad, el método puede comprender además la determinación de que una célula es una célula progenitora ótica humana si

- a) los miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares positivos se unen al menos a tres marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
- b) los miembros de unión dispuestos para unirse al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes se unen al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes en la célula, y un marcador de unión dispuesto para unirse al marcador celular negativo CD141 no se une a la célula.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para enriquecer células progenitoras óticas humanas a partir de una población mixta de células, que comprende el método:

- identificar las células progenitoras óticas humanas de acuerdo con la invención en la presente descripción; y
- clasificar las células de manera que las células progenitoras óticas humanas se aislen de las células progenitoras no óticas, de manera que las células progenitoras óticas humanas se enriquezcan en la población.

En una modalidad, el aislamiento de las células progenitoras óticas humanas puede ser completo (es decir, aislamiento del 100 % de las células progenitoras no óticas). En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 20 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 15 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 10 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 8 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 5 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 3 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 2 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 1 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 0,1 % de células progenitoras no óticas en la población. En otra modalidad, las células progenitoras óticas humanas pueden enriquecerse de manera que haya menos del 0,01 % de células progenitoras no óticas en la población.

El enriquecimiento puede realizarse después de una sola ronda de clasificación. Alternativamente, se pueden proporcionar múltiples rondas de clasificación, por ejemplo, para enriquecer más o asegurar un mayor porcentaje de progenitores óticos humanos en la población.

Las células progenitoras no óticas se pueden descartar, destruir, secuestrar o contener de cualquier otra manera por separado de las células progenitoras óticas humanas.

En una modalidad, el proceso de enriquecimiento mantiene la viabilidad de las células progenitoras óticas humanas.

En una modalidad, la clasificación se realiza mediante FACS. En otra modalidad, el enriquecimiento y clasificación de células progenitoras óticas humanas se realiza mediante el uso de al menos una columna de afinidad. Alternativamente,

el método puede ser con el uso de perlas magnéticas que se unen selectivamente a las células progenitoras óticas humanas. En otra modalidad, el enriquecimiento y clasificación de las células progenitoras óticas humanas se realiza mediante el uso de MACS.

5 Ventajosamente, el uso de FACS proporciona enriquecimiento y clasificación de células con alta precisión y reduce la necesidad de múltiples pases de clasificación, porque FACS permite el uso de múltiples etiquetas de fluoróforos diferentes y, por lo tanto, la selección de múltiples marcadores de células al mismo tiempo.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una población de células progenitoras óticas humanas, que comprende el método:

- diferenciar, desdiferenciar, transdiferenciar o reprogramar de forma directa una población de células progenitoras no óticas en células progenitoras óticas humanas, de manera que algunas células progenitoras no óticas pueden permanecer en la población para formar una población mixta de células; y
- 15 • enriquecer las células progenitoras óticas humanas de la población mixta de células de acuerdo con el método de la invención en la presente descripción.

20 Diferenciar una población de células progenitoras no óticas puede comprender diferenciar una población de células madre, como las iPSC. Por ejemplo, las células progenitoras no óticas pueden comprender células madre, como iPSC. Desdiferenciar una población de células progenitoras no óticas puede comprender desdiferenciar una población de células más maduras. Por ejemplo, las células progenitoras no óticas pueden comprender células maduras (completamente diferenciadas). La transdiferenciación o la reprogramación dirigida de una población de células progenitoras no óticas pueden comprender la transdiferenciación o la reprogramación dirigida de una población de células de un linaje diferente (es decir, linaje no ótico).

25 Los expertos en la técnica conocen muchos agentes de diferenciación que pueden diferenciar las células madre en tipos específicos de células, tales como células progenitoras óticas. Por lo tanto, se prevé que las células madre se puedan diferenciar en células progenitoras óticas mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Algunos ejemplos de agentes de diferenciación incluyen, entre otros, ligandos de FGF, inhibición y activación de WNT, TGF1, inhibición y activación de TGF, suero fetal de ternera, factor de crecimiento nervioso, eliminación de EGF, eliminación de bFGF (o ambos), BDNF, hormona tiroidea, BMP, LIF, sonic hedgehog, GDNF, VEGF, interleucinas, interferones, SCF, activinas, inhibinas, quimiocinas, ácido retinoico y CNTF.

35 La diferenciación puede estar de acuerdo con, pero no limitado a, el protocolo descrito por Chen y otros, (2012. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. Nature, 490(7419):278-82. doi: 10.1038/nature11415), o Ronaghi y otros, (2014. Stem Cells Dev, 23(11), 1275-1284) En particular, la diferenciación puede comprender la inducción de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) con FGF3 y FGF10, opcionalmente en donde las concentraciones de FGF3 y FGF10 son cada una de aproximadamente 50 ng/ml. La diferenciación puede comprender las etapas descritas en la Figura 1a en la presente descripción o Chen y otros, 2012. Alternativamente, la diferenciación puede comprender la inducción de FGF con FGF3 y FGF10, y la manipulación de la señalización de WNT por inhibición de WNT seguida de inducción de WNT (ver Figura 1b en la presente descripción). La diferenciación puede comprender las etapas descritas en la Figura 1b en la presente descripción.

45 Se prevé que las células progenitoras no óticas pueden ser células madre de cualquier fuente conocida, como tejido post-embriionario. En una modalidad, las células progenitoras no óticas para la diferenciación comprenden o consisten en células madre pluripotentes, tales como células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las células progenitoras no óticas pueden comprender células fetales. En otra modalidad, las células progenitoras no óticas pueden comprender células madre de otros tejidos, tales como tejido mesenquimatoso, tejido graso u otros tejidos.

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que comprende al menos dos miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados entre SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

55 En una modalidad, el kit puede comprender al menos tres miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

60 En otra modalidad, el kit puede comprender al menos cuatro miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

En otra modalidad, el kit puede comprender al menos cinco miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados entre SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

En otra modalidad, el kit puede comprender un panel de miembros de unión, en donde el panel de miembros de unión comprende un miembro de unión específico para cada uno de los marcadores celulares de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

- 5 Los miembros de unión del kit pueden comprender anticuerpos como se describe en la presente descripción. Los miembros de unión del kit pueden etiquetarse como se describe en la presente descripción.

10 En una modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA1 comprende el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo HI98 o 480-1-1. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un anticuerpo que tiene los mismos CDR que el anticuerpo HI98 o 480-1-1.

20 En una modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA4 comprende el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a SSEA4 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo MC-813-70.

25 En una modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a TRA-2-49 comprende el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a TRA-2-49 puede comprender un anticuerpo que tiene los mismos CDR que el anticuerpo TRA-2-49/6E.

35 En una modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD2 comprende uno cualquiera de los anticuerpos 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD2 puede comprender un miembro de unión, como un anticuerpo, capaz de competir por unirse con cualquiera de los anticuerpos 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD2 puede comprender un miembro de unión, como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD2 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que cualquiera de los anticuerpos 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD2 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que cualquiera de los anticuerpos 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22.

45 En una modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD3 comprende el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD3 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD3 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD3 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a GD3 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo DMab-7 o VINIS56.

55 En una modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a CD141 comprende el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a CD141 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de competir por la unión con el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a CD141 puede comprender un miembro de unión, tal como un anticuerpo, capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a CD141 puede comprender un anticuerpo que tiene la misma cadena VL y VH que el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usar para identificar/unirse a CD141 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo 1A4.

65 El kit puede comprender además reactivos o elementos de unión adecuados para la detección de la etiqueta.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de CD141 como marcador celular negativo para identificar células progenitoras no óticas en una población mixta de células.

El uso puede comprender la determinación de la presencia o ausencia de CD141 en una célula.

Una modalidad adicional es el uso de marcadores de superficie de células progenitoras óticas humanas, tanto positivos como negativos, para estudiar el comportamiento de las células progenitoras óticas humanas y madre durante el desarrollo y en la madurez.

Una modalidad de la invención adicional es el uso de marcadores celulares específicos de células progenitoras óticas humanas como dianas para la manipulación farmacológica de células progenitoras óticas humanas *in vitro* después del aislamiento o la diferenciación.

Una "célula progenitora ótica" como se usa en la presente es una célula que es una célula biológica que, como una célula madre, tiene una tendencia a diferenciarse en tipos específicos de células, pero ya es más específica que una célula madre y es empujada a diferenciarse en una célula relacionada con la audición, como las células similares a las células ciliadas o las neuronas auditivas. Una diferencia entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre pueden replicarse indefinidamente, mientras que las células progenitoras pueden dividirse solo un número limitado de veces. Los métodos actuales de identificación pueden incluir una serie de factores de transcripción usados como marcadores moleculares, como PAX2, PAX8, FOXG1, SOX2, por nombrar algunos. Las células progenitoras óticas se encuentran *in vivo*, durante el desarrollo fetal, en la placa ótica, el otoquiste y en la región prosensorial del epitelio sensorial prospectivo. Su presencia en el oído adulto y maduro todavía está en debate. Sin embargo, algunas células de soporte pueden tener propiedades parecidas a las de progenitoras. Como se usa en la presente, la solicitud describe aspectos relacionados con los progenitores óticos humanos. Sin embargo, también se puede entender que todos los aspectos descritos en la presente descripción en relación con los progenitores óticos humanos se refieren a mamíferos de manera más general.

El término "marcador de superficie celular positivo" usado en la presente descripción se entiende que significa un marcador, tal como una molécula, que está en la superficie de los progenitores óticos y puede usarse, quizás con otros marcadores, para verificar positivamente la identidad de los progenitores óticos. La referencia a "marcador de superficie celular positivo" o "marcador celular positivo" en la presente descripción pretende hacer referencia a uno de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 o GD2.

Se entiende que el término "marcador de superficie celular negativo" usado en la presente descripción significa un marcador, tal como una molécula, que se encuentra en la superficie de una célula, que no se encuentra en los progenitores óticos. Por lo tanto, las células que tienen dicho marcador negativo pueden verificarse como progenitoras no óticas. La referencia a "marcador de superficie celular negativo" o "marcador celular negativo" en la presente descripción pretende hacer referencia a CD 141.

El término "enriquecer" o "enriquecido" usado en la presente descripción pretende significar que la proporción de células progenitoras óticas aumenta en una población de células con relación a las células progenitoras no óticas. De cualquier otra manera, el enriquecimiento puede considerarse como la clasificación de células progenitoras óticas de células progenitoras no óticas. En el enriquecimiento, las células progenitoras óticas pueden aislarse de las células progenitoras no óticas o viceversa.

La invención no excluye el uso de los marcadores celulares descritos en la presente descripción en combinación con otros marcadores celulares conocidos o identificados en el futuro.

"Específico" o "unión específica" se usa generalmente para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su (s) pareja (s) de unión específica y, por ejemplo, tiene menos de aproximadamente un 30 % de reactividad cruzada con cualquier otra molécula. En otras modalidades, tiene menos del 20 %, 10 % o 1 % de reactividad cruzada con cualquier otra molécula. En este contexto, un miembro de unión que está "dispuesto para unirse" a un marcador celular particular es un miembro de unión que es capaz de unirse específicamente al marcador celular, es decir, se configura para unirse a dicho marcador sin una unión significativa de otras moléculas. Cuando el contexto lo permita, los términos "dispuesto para unirse" y "unirse específicamente" pueden usarse indistintamente.

El experto entenderá que las características opcionales de una modalidad o aspecto de la invención pueden aplicarse, cuando sea apropiado, a otras modalidades o aspectos de la invención.

Habiendo descrito ahora en general la invención, se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

## EJEMPLOS

El trabajo que llevó a esta invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Unión Europea FP7/HEALTH-2013-INNOVATION-1 bajo el Acuerdo de Subvención Número 603029.

Purificación de progenitores óticos de poblaciones celulares heterogéneas

Introducción

La necesidad de una purificación prospectiva de los progenitores óticos.

Los protocolos optimizados para las hPSC directas producen (en el mejor de los casos) poblaciones de células con una alta representación del tipo de célula deseado debido a una serie de limitaciones clave en nuestra capacidad para controlar las células madre. Problemas como los cultivos de partida heterogéneos, la variación de un lote a otro en los factores de crecimiento, el medio y otros consumibles, la variabilidad de la línea celular y la densidad de siembra celular pueden afectar la eficiencia de la diferenciación. Se han desarrollado varios protocolos para generar progenitores óticos a partir de hPSC [1,2], pero todos dan lugar a cultivos mixtos con solo un subconjunto de los progenitores mismos. Actualmente, los experimentos de diferenciación ótica se limpian manualmente para purificar los progenitores, lo que implica eliminar los tipos de células no deseados en función de la morfología y/o la expresión de genes indicadores. Si bien este enfoque ha sido efectivo para facilitar las diferenciaciones de células ciliadas/neuronales en sentido descendente, es a la vez laborioso y propenso a traspasar una pequeña proporción de tipos de células no progenitoras. Por lo tanto, para que las terapias con células madre progresen hacia aplicaciones clínicas, se requiere un método objetivo más preciso que pueda ampliarse a un gran número de células.

La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es una técnica comúnmente usada para separar subgrupos de células dentro de una población en función de la expresión diferencial de marcadores de superficie celular. El método requiere la identificación de perfiles de expresión de proteínas de superficie celular únicos en las células que se van a clasificar de una población heterogénea, combinada con la disponibilidad de anticuerpos adecuados para esas proteínas. Hemos estado rastreando anticuerpos que se sabe que se unen a los antígenos de la superficie celular en cultivos de hESC que se han sometido a diferenciación ótica para identificar candidatos para su uso en FACS para purificar progenitores óticos.

Se han desarrollado protocolos para impulsar las hPSC a lo largo de linajes de diferenciación ótica hacia fenotipos de neuronas sensoriales y células ciliadas a través de estados intermedios denominados "progenitores óticos". Los protocolos usados para derivar progenitores óticos involucran la inducción de FGF con FGF3 y FGF10 (Figura 1a y Chen y otros, 2012), y un método más reciente que incorpora la manipulación de la señalización de WNT, agregando una etapa de inhibición de WNT (mediante el uso de IWR-1-endo) seguido de inducción de WNT (con BIO) (Figura 1b).

El cribado de anticuerpos se ha llevado a cabo en poblaciones de células heterogéneas que resultan de los dos protocolos anteriores en un esfuerzo por encontrar marcadores de superficie celular adecuados que puedan usarse para purificar las poblaciones de progenitores óticos mediante FACS.

Métodos y resultados

Las hESC de Shef3.2, reportero de H14-NOP-SOX2 y cultivos de H14s9 se diferenciaron en placas de 96 pocillos mediante el uso del "protocolo FGF" (Figura 1a) o el "protocolo WNT" (Figura 1b). Los cultivos resultantes se tiñeron en vivo con paneles de anticuerpos de superficie celular antes de la fijación y la obtención de imágenes en el IN Cell Analyzer 2200. Hubo tres etapas de detección:

1. Cribado piloto mediante el uso de anticuerpos CSCB. Se usó la línea informadora H14-NOP-SOX2 y el protocolo WNT.
2. Pantalla principal mediante el uso de un panel de detección de marcadores de superficie de células humanas BD lyoplate con 242 anticuerpos. Se usaron la línea H14s9 y el protocolo WNT. (3 placas replicadas)
3. Pantalla principal mediante el uso de un panel de detección de marcadores de superficie de células humanas BD lyoplate con 242 anticuerpos. Se usó la línea Shef3.2 y el protocolo FGF. (2 placas replicadas)

Después de la obtención de imágenes, los datos se procesaron mediante el uso del software Developer Toolbox y se analizaron con Excel y SPSS.

Los tres experimentos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. "PILOT" se realizó mediante el uso del panel de anticuerpos CSCB, "BD RUN" se realizó mediante el uso del panel de cribado BD Lyoplate Human Cell Surface Marker.

|                   | PILOTO       | BD RUN 1 | BD RUN 2 |
|-------------------|--------------|----------|----------|
| LÍNEA             | H14-NOP-SOX2 | H14s9    | Shef3.2  |
| PLACAS DE RÉPLICA | 2            | 3        | 2        |

1.1 Prueba piloto mediante el uso del panel de anticuerpos CSCB-Sheffield

La fase inicial del cribado usó un panel relativamente pequeño de anticuerpos disponibles en el Centro de Biología de Células Madre en Sheffield (Tabla 2).

5 Tabla 2. Panel de anticuerpos del Centro de Biología de Células Madre usados para el cribado inicial

|    |                                             |
|----|---------------------------------------------|
|    | <b>Panel de anticuerpos CSCB</b>            |
|    | P3X AG (control negativo)                   |
| 10 | TRA-1-85 (control positivo)                 |
|    | 480-1-1 (también conocido como SSEA1, CD15) |
|    | 813-70 (también conocido como SSEA4)        |
| 15 | TRA-1-60s                                   |
|    | TRA-1-81                                    |
|    | TRA-2-49/6E                                 |
| 20 | ME20.4 (también conocido como P75)          |
|    | B159                                        |
|    | TRA-2-10                                    |
| 25 | VINIS 53                                    |
|    | ME311                                       |
|    | HNK-1                                       |
| 30 | VIN2 PB22 (también conocido como GD2)       |
|    | VINIS 56 (también conocido como GD3)        |
|    | A2B5                                        |

35 Una línea informadora de hESC que expresa EGFP impulsada por un potenciador SOX2 específico de placode nasal y ótico se diferencia mediante el uso del protocolo "WNT" (Figura 1b). La tinción en vivo se llevó a cabo mediante el uso del panel de anticuerpos al final de la inducción ótica (~12 días), y luego las células se fijaron antes de marcar todas con Hoechst y obtener imágenes mediante el uso de un sistema de microscopía automatizada (IN Cell Analyzer 2200, GE Healthcare).

40 Mediante el uso del software Developer, se identificaron células individuales en función de la expresión de Hoechst, luego se registró la intensidad de fluorescencia de GFP (indicador SOX2 dentro de las células) y Alexa 568 (el fluorocromo unido al anticuerpo secundario usado contra los anticuerpos marcadores de superficie celular) y usado para definir la expresión positiva en cada celda. La positividad se definió como una intensidad de fluorescencia superior a la observada en los pocillos de control negativo de IgG no reactivos (IgG producidas por la línea de mieloma parental P3X63Ag8).

45 Se usaron dos placas de 96 pocillos en este cribado primario que varió solo ligeramente en el método de tinción: la placa 1 se tiñó de acuerdo con el protocolo de bioimagen de BD Lyoplate mediante el uso de FBS al 5 % en DMEM como medio de crecimiento con anticuerpos añadidos y la placa 2 como en la placa 1 pero con FBS al 5 % en PBS (con CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>) en lugar de medio de crecimiento.

50 Se revelaron varios resultados potenciales en el panel de anticuerpos de CSCB. La Figura 2 muestra los datos de este experimento mostrados con cada anticuerpo en un panel separado, el eje x se refiere a la intensidad de fluorescencia del indicador SOX2 (GFP) y el eje y se refiere a la intensidad de fluorescencia del marcador de superficie celular. Los paneles están dispuestos de arriba a la parte inferior según la proporción de células positivas para el marcador de superficie celular, siendo la parte superior izquierda la más positiva y la parte inferior derecha la menos positiva. TRA-1-85 es un anticuerpo de control positivo, P3X es un anticuerpo de control negativo. Los mejores resultados se encuentran en la primera columna hasta los candidatos más pobres en la última.

60 Un método de análisis diferente basado en el porcentaje de células positivas en cada pocillo y el número de pocillos replicados por anticuerpo que obtuvieron una puntuación positiva en los umbrales >25 % o >10 % confirmó los tres primeros resultados como SSEA1, GD3 y TRA-2-49, con SSEA4 (813-70) inmediatamente más abajo.

65 Hubo poca diferencia entre las incubaciones de anticuerpos realizadas en PBS o en DMEM, por lo que se eligió DMEM para experimentos futuros ya que forma un componente del medio de diferenciación en el que se cultivan las células durante la inducción ótica. No se encontró que la tinción en vivo afecte adversamente a las células de ninguna manera

obvia (es decir, sin desprendimiento adicional de células durante el protocolo), y se recomienda en los métodos BD Lyoplate ya que la fijación previa puede dar lugar a resultados falsos. La tinción viva también sería más apropiada para aplicaciones futuras cuando se necesiten progenitores vivos para manipulaciones adicionales.

## 5 1.2 Verificación inicial de aciertos del Panel CSCB

Los anticuerpos SSEA-1 y GD3 se eligieron para verificar que se unen eficazmente a la subpoblación progenitora ótica. Para liberar el canal de GFP en el microscopio, volvimos a la línea de hESC parental a partir de la cual se generó el informador, H14s9. Las células se diferenciaron de la misma manera que en el cribado primario y luego se tiñeron en vivo con anticuerpos SSEA-1 y GD3 (en múltiples pocillos separados, es decir, sin observar la coexpresión de las proteínas de superficie). A continuación, las células se fijaron y se permeabilizaron para que pudieran ser exploradas en busca de marcadores óticos nucleares (de transcripción), PAX2, SOX2 y FOXG1. Hoechst se usó de nuevo para identificar los núcleos de células individuales. Se usaron los mismos métodos de análisis y recogida de datos que en la pantalla principal. Estos datos indican que la población positiva a SSEA1 es un subconjunto de las células positivas para cada uno de los tres factores de transcripción (Tabla 3i). Los datos para GD3 son similares, excepto que una proporción (3,4 %) de células que son positivas para GD3 no son positivas para PAX2 (Tabla 3ii). Esto, combinado con los datos morfológicos que muestran la tinción con GD3 de algunas células no asociadas con una morfología progenitora ótica, sugiere que GD3 discrimina menos el subconjunto celular deseado que SSEA1. Ver la Figura 3.

20 Tabla 3i. Porcentaje de células positivas para marcadores progenitores óticos y SSEA1.

| Anticuerpos | +/+ | +/-  | -/+ | -/-  |
|-------------|-----|------|-----|------|
| PAX2/SSEA1  | 7.2 | 40.0 | 0.5 | 52.3 |
| FOXG1/SSEA1 | 5.9 | 78.2 | 0.1 | 15.7 |
| SOX2/SSEA1  | 7.3 | 79.4 | 0.2 | 13.2 |

30 Tabla 3ii. Porcentaje de células positivas para marcadores progenitores óticos y GD3.

| Anticuerpos | +/+ | +/-  | -/+ | -/-  |
|-------------|-----|------|-----|------|
| PAX2/GD3    | 7.2 | 45.3 | 3.4 | 44.0 |
| FOXG1/GD3   | 8.6 | 75.7 | 0.2 | 15.4 |
| SOX2/GD3    | 8.6 | 78.5 | 0.4 | 12.4 |

## 40 2.1 Cribado del panel de anticuerpos BD Lyoplate

El trabajo con CSCB Antibody Panel demostró la viabilidad de usar el método automatizado de bioimagen para detectar marcadores de superficie celular y permitió una optimización completa del sistema antes de emprender una pantalla más completa basada en el panel de detección de marcadores de superficie de células humanas BD Lyoplate (BD Biosciences). Este panel analiza la unión de 242 anticuerpos y se esperaba que extendiera el número de marcadores identificados.

El cribado de lioplasmas BD permite ejecutar 5 réplicas en placas de 96 pocillos. Dividimos el experimento en dos. Se realizaron tres réplicas mediante el uso de la línea celular H14s9 diferenciada usando el protocolo WNT, mientras que las dos restantes usaron la línea celular Shes3.2 con el protocolo FGF. Por tanto, este diseño experimental había incluido 5 réplicas totales, que cubrían 2 líneas celulares independientes y 2 protocolos de diferenciación diferentes. Creíamos que esto maximizaría las posibilidades de extraer los mejores candidatos para marcadores de superficie de progenitores óticos.

Después de procesar los datos, se realizó un análisis para identificar el número total de células en el pocillo y las que se consideran positivas. El umbral positivo se calculó placa por placa mediante el análisis del pocillo A1, que se define como un control (libre de anticuerpos primarios) en cada placa. A continuación, se calculó el porcentaje de células positivas para cada pocillo. A continuación, se recopilaron estos datos para cada una de las 3 placas de anticuerpos BD, es decir, 5 réplicas para cada placa, 3 para H14s9 y 2 para Shes3.2.

60 Luego se emplearon dos tipos diferentes de análisis, primero mediante el uso de criterios objetivos basados en la intensidad y luego mediante el uso de criterios subjetivos basados en la morfología.

### Análisis objetivo de los umbrales de etiquetado

1. Dimos a cada pocillo un valor de porcentaje positivo y enumeramos las 5 réplicas una al lado de la otra para comparar.
2. Las células que fueron <10 % positivas se clasificaron como negativas, ≥10 % se clasificaron como positivas.

3. Si 3 o más pocillos replicados eran negativos, entonces el pocillo y el anticuerpo correspondiente se clasificaron como no candidatos y se eliminaron de la consideración futura.

4. Si los 4 o 5 pocillos son >80 % positivos, se considera que el anticuerpo no es lo suficientemente discriminatorio (es decir, que se une a demasiados tipos de células) y, por lo tanto, se clasifica como no candidato y se elimina de la consideración futura.

5. Comprobamos que los pocillos restantes tenían un mínimo de 3 réplicas positivas que abarcan las dos líneas celulares, es decir, si las réplicas 1-3 son positivas (las réplicas de H14s9) pero 4 y 5 son ambas negativas (las réplicas de Shef3.2), entonces el pocillo debe ser excluido ya que esto sugiere que el anticuerpo se une específicamente a una línea (o posiblemente solo a las células que se han sometido a diferenciación a través del protocolo WNT opuesto al protocolo FGF).

La Figura 4 muestra niveles de corte de los datos de parte de la placa 1 usados para ilustrar cómo se implementaron los criterios explicados anteriormente. Se muestran los datos de los pozos F5 a G6 y los datos de porcentaje se han formateado de manera que cuanto mayor sea el porcentaje, más oscuro será el sombreado, para hacer más fácil ver las diferencias. Las réplicas 1-3 son las réplicas del protocolo H14s9/WNT. Las réplicas 4 y 5 son las réplicas del protocolo Shef3.2/FGF.

En la Figura 4a, los pocillos delineados caen en las 3 o más réplicas negativas (punto 3 anterior) y, por lo tanto, se eliminan como no candidatos. En la Figura 4b, los pozos descritos caen en la categoría de insuficientemente discriminatorios (punto 4 anterior) y, por lo tanto, se eliminan como no candidatos. En la Figura 4c, los pocillos descritos caen en la categoría de unión específica de línea/protocolo (punto 5 anterior), por lo que también se eliminan como no candidatos.

#### Análisis subjetivo basado en morfología

Una vez que se eliminaron todos los pocillos no candidatos, volvimos a los datos de la imagen y verificamos los pozos restantes para ver si el anticuerpo se unía de hecho a la población que clasificaríamos como progenitores óticos solo por morfología. Este análisis solo se realizó en las réplicas de Shef3.2, ya que los H14s9 eran demasiado confluentes para medir las morfologías a simple vista.

En conjunto, estos análisis confirman tres de los mejores candidatos identificados en la selección piloto inicial (SSEA1, SSEA4 y GD2). GD3 y TRA2-49 (fosfatasa alcalina) no estaban representados en BD Lyoplate. Aunque se identificaron algunos marcadores positivos de 'segundo nivel', no pasaron los estrictos criterios establecidos en este estudio inicial y solo se cumplen estos cinco (SSEA1, SSEA4, GD2, GD3 y TRA2-49).

Además, identificamos CD141 como un marcador de exclusión, ya que etiqueta a la mayoría de los otros tipos de células, pero no a los progenitores.

#### Métodos para las Figuras 6 y 7

Se fijaron fetos humanos de diferente edad gestacional durante dos horas en PFA al 4 % en PBS a 4 °C. A continuación, las muestras se crioprotegieron en una serie ascendente de sacarosa al 5 %-30 % en PBS y se incrustaron en Cryo-M-Bed (Bright), antes de congelarse en isopentano líquido enfriado en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones seriadas de diez µm de espesor en un criostato y se recogieron en portaobjetos recubiertos de gelatina. Las secciones se lavaron brevemente con PBS y se incubaron durante 15-30 minutos en tampón de bloqueo (0,1 % Triton 5 % Suero de burro normal en PBS) a temperatura ambiente. Los anticuerpos usados fueron: anti-CD141 (Biolegend) y anti-neurofilamento 200 (Sigma). Las señales se visualizaron mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados con Alexa. La contratinción nuclear se realizó con DAPI (Sigma).

#### Métodos para las Figuras 8 y 9

Se indujo a las hESC de la línea Shef3.2 a diferenciarse en progenitores óticos durante 14 días mediante el uso del "protocolo FGF", como se describió en [1]. En esta etapa, las células no fijadas se etiquetaron con anticuerpos SSEA4, TRA-2-49 y CD141, directamente conjugados con los fluorocromos Alexa 647, Alexa 488 o violeta brillante 421, respectivamente (Biolegend). Las células se separaron y analizaron mediante el uso de un BD FACSJazz.

Para la Figura 9, se permitió que las células clasificadas y no clasificadas se diferenciaran aún más durante 17, 20 y 26 días en células similares a células ciliadas, mediante el uso de un sistema de cultivo de organoide (3D) desarrollado en nuestro laboratorio. La diferenciación en células similares a células ciliadas también podría lograrse mediante el uso de un método publicado (por ejemplo, [2]). Se extrajo el ARN y se analizó la expresión génica por qPCR mediante el uso de un método DD-Ct.

Estos resultados sugieren que la población doble positiva SSEA4+/TRA2-49+ contiene células progenitoras capaces de diferenciarse en el linaje de células ciliadas, incluso cuando se aísla de la fracción no SSEA4/TRA2-49 doble positiva (células simples positivas o negativas). La población no clasificada todavía pudo diferenciarse, dado que contiene un porcentaje relativamente grande de células SSEA4+/TRA2-49+ (54,8 ± 5,6 %, media ± sem).

Referencias

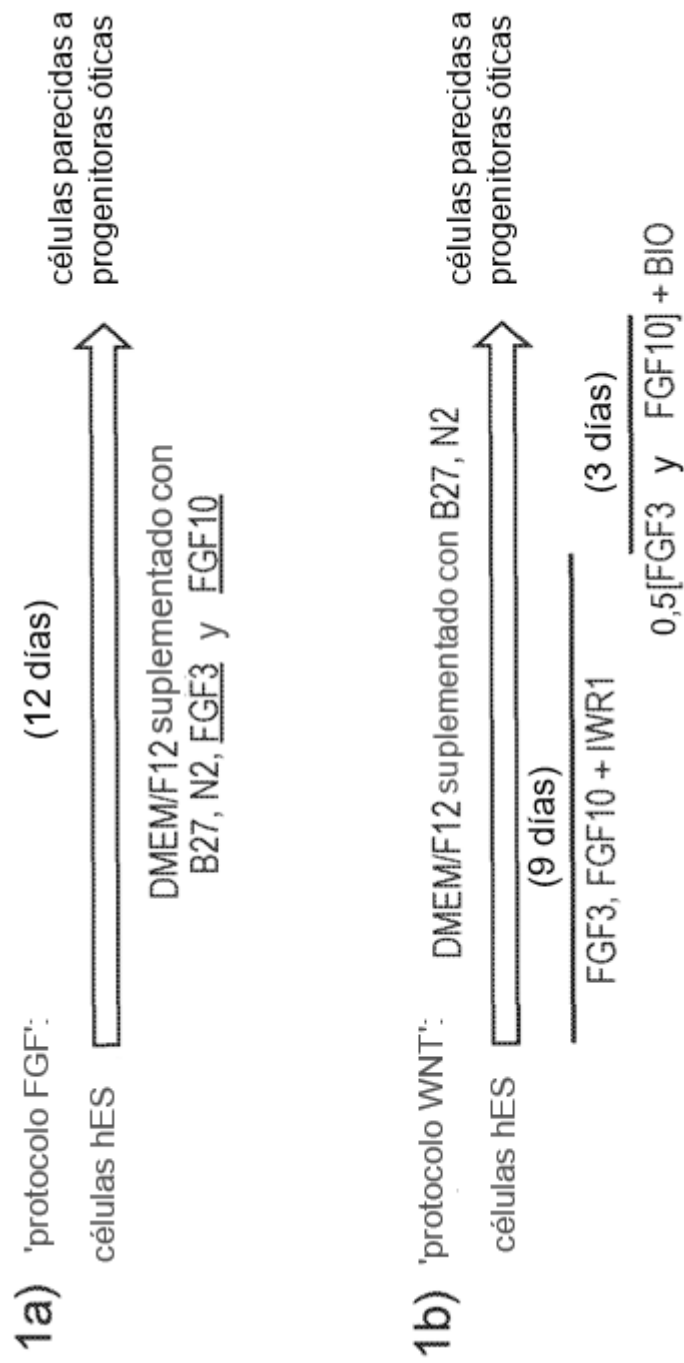
- 5 [1] Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S.J., Johnson, S.L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J.K., Andrews, P.W., Marcotti, W., Moore, H.D., Rivolta, M.N. "Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. " *Nature*, 490, 278-282, 2012.
- [2] Ronaghi, M., Nasr, M., Ealy, M., Durruthy-Durruthy, R., Waldhaus, J., Diaz, G.H., Joubert, L.M., Oshima, K., Heller, S. "Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. " *Stem Cells Dev*, 23(11), 1275-1284, 2014.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de identificación de células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células que comprende determinar si una célula tiene al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados entre SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
  - a) los marcadores celulares SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2 son marcadores celulares positivos; y/o
  - b) el marcador celular CD141 es un marcador celular negativo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde:
  - (a) se usan al menos dos marcadores celulares positivos en combinación para identificar progenitores óticos humanos; o
  - (b) se usan al menos tres, cuatro o cinco marcadores celulares positivos en combinación para identificar progenitores óticos humanos; o
  - (c) se usan un marcador celular positivo, o al menos dos marcadores celulares positivos en combinación con el marcador celular negativo CD141.
4. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la población mixta de células se proporciona a partir de, o durante, un protocolo de diferenciación de células madre pluripotentes *in vitro*, opcionalmente en donde las células madre pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas (iPSC); o en donde la población mixta de células se proporciona a partir de, o durante, procedimientos de desdiferenciación, transdiferenciación o reprogramación directa en linajes de células óticas humanas; o en donde la población mixta de células se proporciona a partir de tejido, opcionalmente en donde las células son muestras cocleares o vestibulares obtenidas de intervenciones quirúrgicas de oídos internos adultos.
5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la población mixta de células se pone en contacto con uno o más miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares, opcionalmente en donde el miembro de unión comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o un mimético del mismo.
6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende una etapa de detección, en donde los marcadores celulares se detectan como presentes o no presentes en una célula o grupo de células, opcionalmente en donde la detección comprende el uso de FACS y/o el uso de MACS.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el miembro de unión se etiqueta para su identificación, opcionalmente en donde la etiqueta comprende un fluoróforo.
8. Un método *in vitro* de identificación de células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células mediante el uso de al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141, el método comprende:
  - proporcionar miembros de unión específicos para al menos dos marcadores celulares diferentes;
  - poner en contacto la población mixta de células con los miembros de unión; y
  - detectar la unión o no unión de los miembros de unión a células en la población mixta de células.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende además la determinación de que una célula es una célula progenitora ótica humana si:
  - a) los miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares positivos se unen al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
  - b) un miembro de unión dispuesto para unirse a uno de los marcadores celulares positivos se une al menos a uno de los marcadores celulares positivos en la célula, y un marcador de unión dispuesto para unirse al marcador celular negativo CD141 no se une a la célula,
 opcionalmente en donde el método comprende la determinación de que una célula es una célula progenitora ótica humana si:
  - i) los miembros de unión dispuestos para unirse a los marcadores celulares positivos se unen al menos a tres marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
  - ii) los miembros de unión dispuestos para unirse al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes se unen al menos a dos marcadores celulares positivos diferentes en la célula, y un marcador de unión dispuesto para unirse al marcador celular negativo CD141 no se une a la célula.
10. Un método *in vitro* de enriquecimiento de células progenitoras óticas humanas a partir de una población mixta de células, el método comprende:
  - identificar las células progenitoras óticas humanas de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y

- clasificar las células de manera que las células progenitoras óticas humanas se aislen de las células progenitoras no óticas, de manera que las células progenitoras óticas humanas se enriquezcan en la población, opcionalmente en donde la clasificación comprende FACS y/o comprende MACS.

- 5 11. Un método *in vitro* de producción de una población de células progenitoras óticas humanas, el método comprende:
  - diferenciar las células progenitoras no óticas en células progenitoras óticas humanas, de manera que algunas células progenitoras no óticas puedan permanecer en la población para formar una población mixta de células; y
  - enriquecer las células progenitoras óticas humanas de la población mixta de células de acuerdo con el método de la reivindicación 10.
- 10 12. Un kit que comprende al menos dos miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados entre SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141, opcionalmente en donde el kit comprende al menos tres miembros de unión diferentes, en donde los miembros de unión están dispuestos para unirse a diferentes marcadores celulares seleccionados entre
- 15 SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.
13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el kit comprende un panel de miembros de unión, en donde el panel de miembros de unión comprende un miembro de unión específico para cada uno de los marcadores celulares de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.
- 20 14. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 12 o reivindicación 13, en donde los miembros de unión son anticuerpos, opcionalmente en donde los anticuerpos están marcados.
- 25 15. El uso de CD141 como marcador celular negativo para identificar células progenitoras no óticas humanas en una población mixta de células.



**Figura 1**

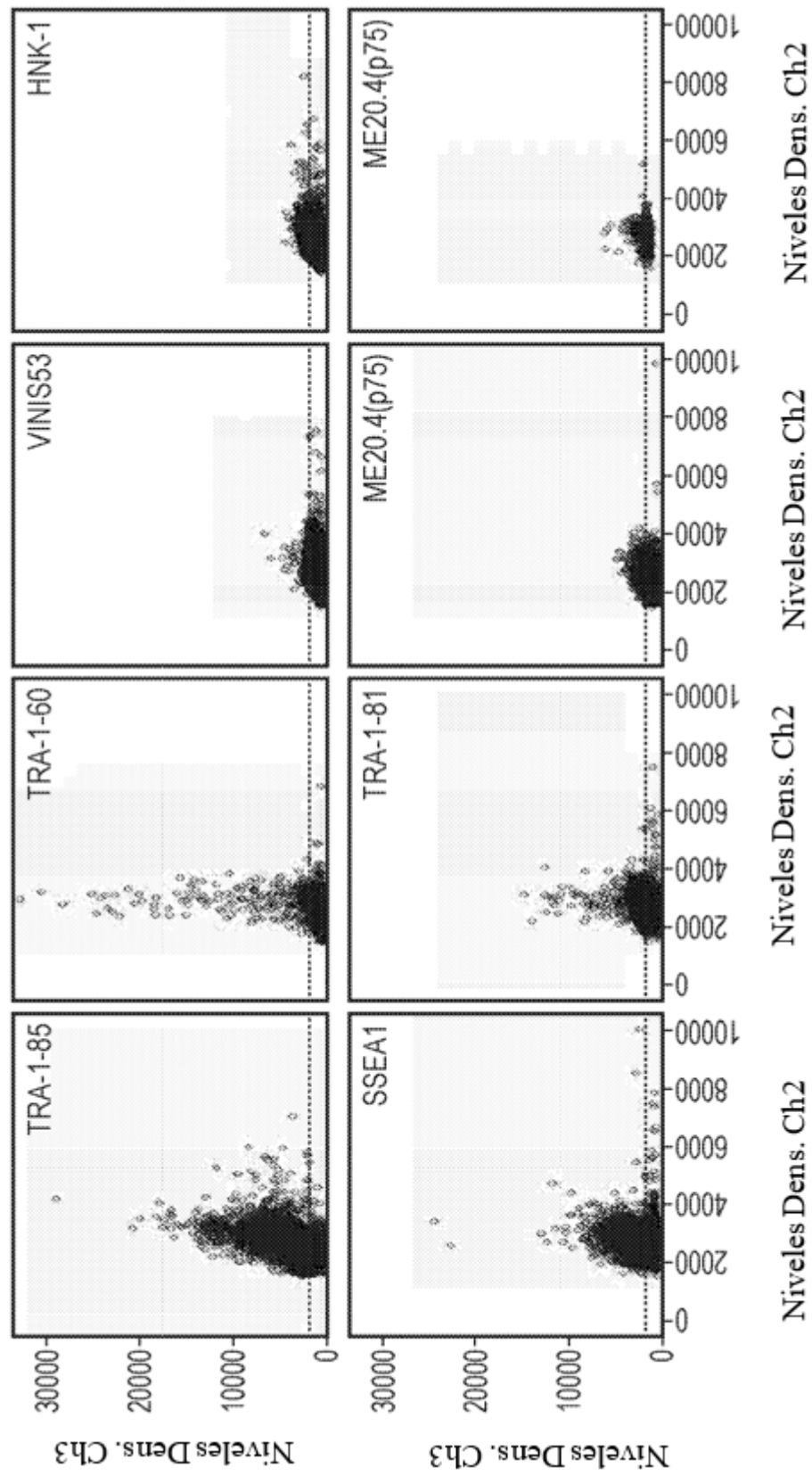


Figura 2

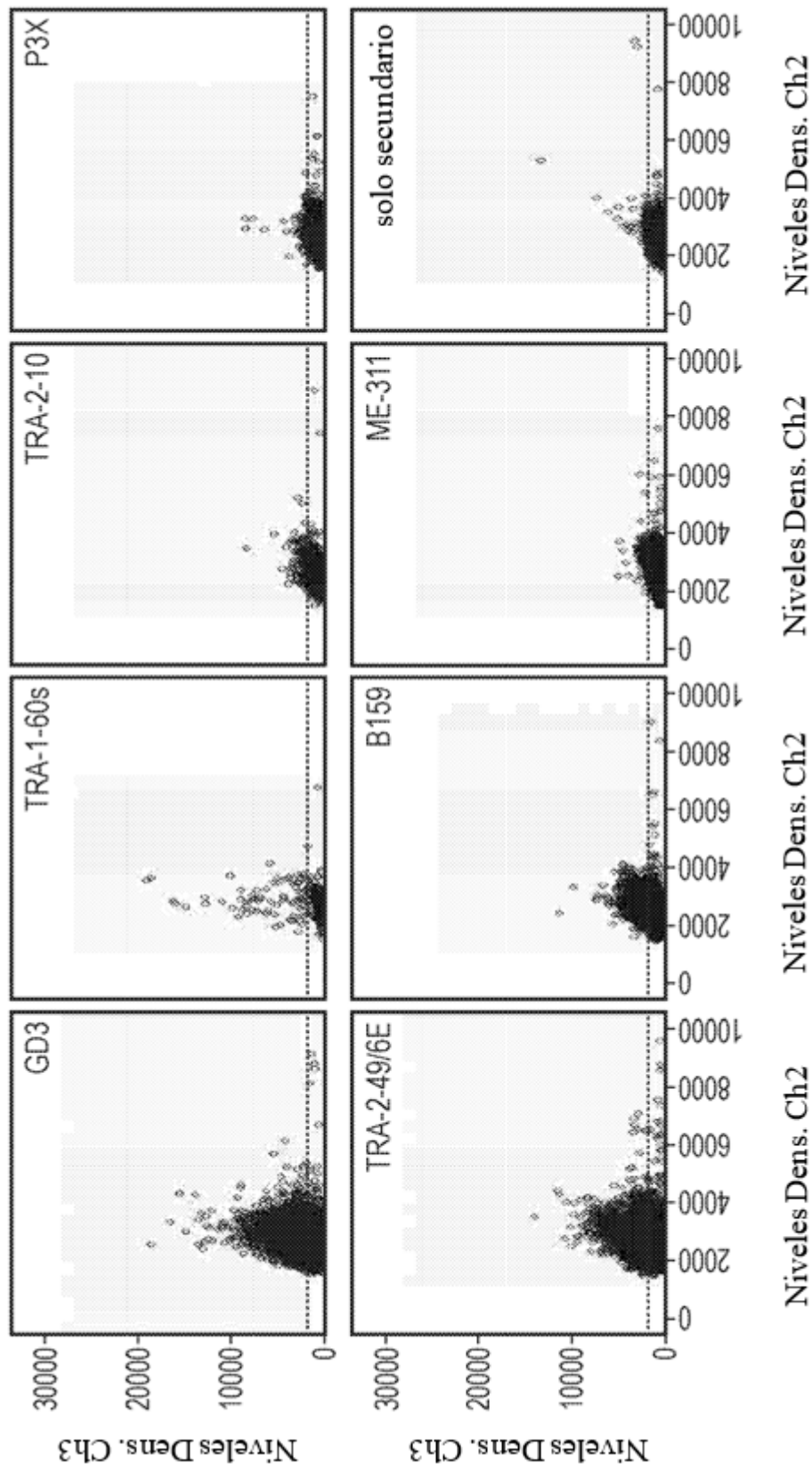


Figura 2 (continuación)

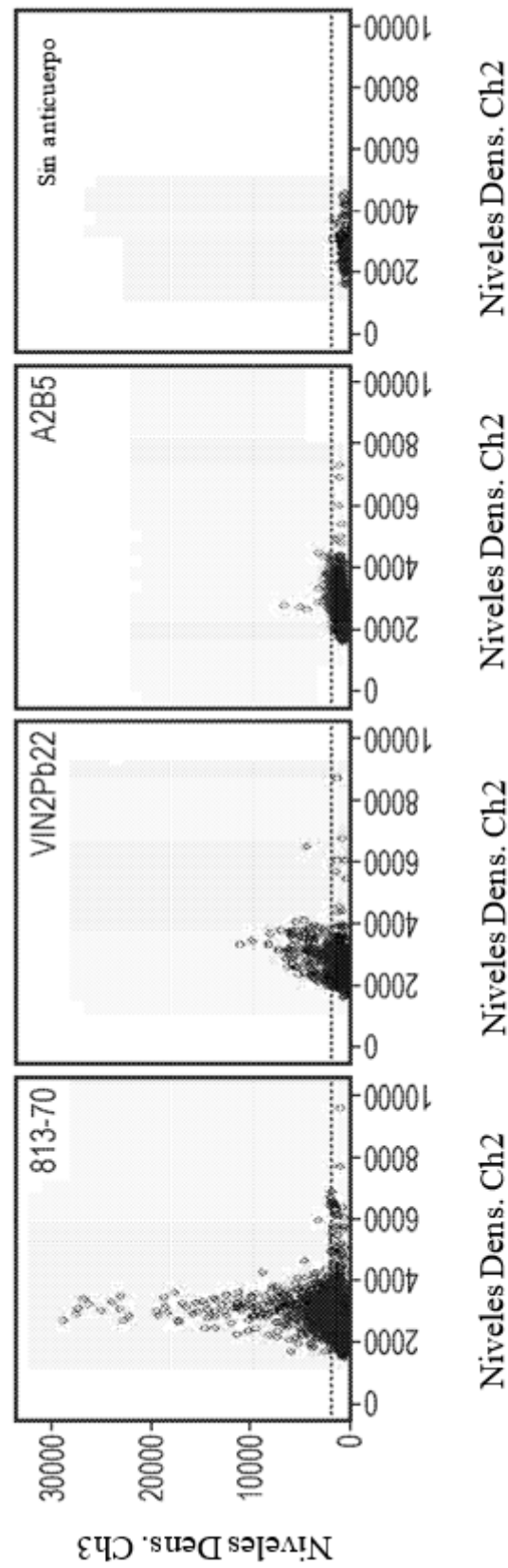


Figura 2 (continuación)

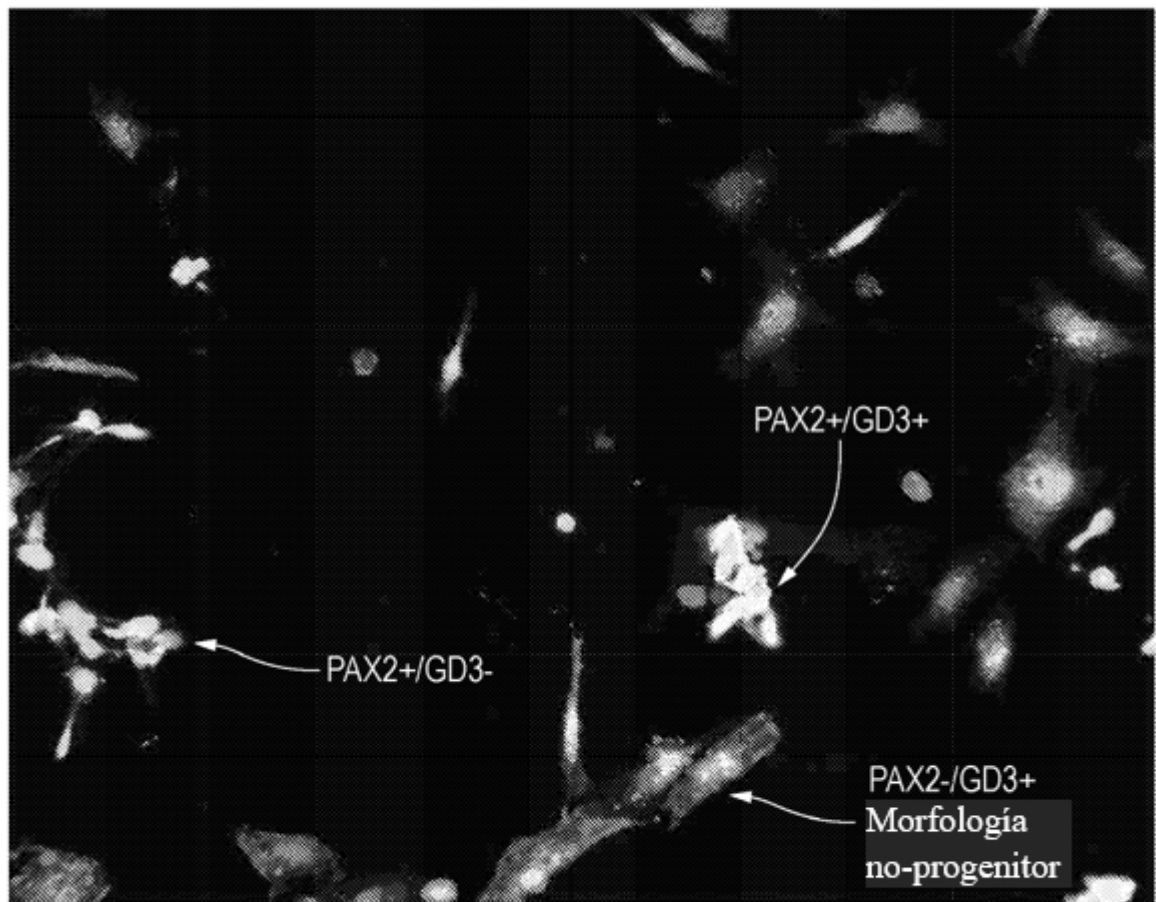


Figura 3

|         | % Positivos         |      |      |                       |      |
|---------|---------------------|------|------|-----------------------|------|
| Pocillo | 1                   | 2    | 3    | 4                     | 5    |
| F-5     | 3,2                 | 3,7  | 0,1  | 2                     | 4    |
| F-6     | 2,7                 | 2,3  | 1,3  | 6,9                   | 5    |
| F-7     | 2                   | 5,4  | 1,1  | 18,6                  | 12,4 |
| F-8     | 15,8                | 48,8 | 2,3  | 38                    | 10,2 |
| F-9     | 78,3                | 96,9 | 4,2  | 21,6                  | 26,4 |
| F-10    | 12,9                | 98,8 | 31,9 | 14,1                  | 7,2  |
| F-11    | 99,4                | 99,9 | 80   | 88,9                  | 96,5 |
| F-12    | 69,6                | 88   | 31,6 | 46,8                  | 47   |
| G-1     | 99,9                | 99,8 | 90,5 | 89,2                  | 80,9 |
| G-2     | 5                   | 14,9 | 0,5  | 16                    | 49,6 |
| G-3     | 2,2                 | 21,3 | 0,6  | 3,1                   | 17,4 |
| G-4     | 3,4                 | 4,1  | 0,5  | 4,5                   | 3,9  |
| G-5     | 1,4                 | 8,4  | 1,4  | 1,9                   | 2,1  |
| G-6     | 87,7                | 98,7 | 63,4 | 30,7                  | 68,1 |
|         | Protocolo H14s9/WNT |      |      | Protocolo Shes3.2/FGF |      |

Muy bajo

Muy bajo

Figura 4a

|         | % Positivos         |      |      |                       |      |
|---------|---------------------|------|------|-----------------------|------|
|         | 1                   | 2    | 3    | 4                     | 5    |
| Pocillo |                     |      |      |                       |      |
| F-5     | 3,2                 | 3,7  | 0,1  | 2                     | 4    |
| F-6     | 2,7                 | 2,3  | 1,3  | 6,9                   | 5    |
| F-7     | 2                   | 5,4  | 1,1  | 18,6                  | 12,4 |
| F-8     | 15,8                | 48,8 | 2,3  | 38                    | 10,2 |
| F-9     | 78,3                | 96,9 | 4,2  | 21,6                  | 26,4 |
| F-10    | 12,9                | 98,8 | 31,9 | 14,1                  | 7,2  |
| F-11    | 99,4                | 99,9 | 80   | 88,9                  | 96,5 |
| F-12    | 69,6                | 88   | 31,6 | 48,8                  | 47   |
| G-1     | 99,9                | 99,8 | 90,5 | 89,2                  | 80,9 |
| G-2     | 5                   | 14,9 | 0,5  | 16                    | 49,6 |
| G-3     | 2,2                 | 21,3 | 0,6  | 3,1                   | 17,4 |
| G-4     | 3,4                 | 4,1  | 0,5  | 4,5                   | 3,9  |
| G-5     | 1,4                 | 8,4  | 1,4  | 1,9                   | 2,1  |
| G-6     | 87,7                | 98,7 | 63,4 | 30,7                  | 68,1 |
|         | Protocolo H14s9/WNT |      |      | Protocolo Shes3.2/FGF |      |
|         | Muy alto            |      |      | Muy alto              |      |

Figura 4b

| % Positivos                             |      |      |                       |      |      |
|-----------------------------------------|------|------|-----------------------|------|------|
|                                         | 1    | 2    | 3                     | 4    | 5    |
| Pocillo                                 |      |      |                       |      |      |
| F-2                                     | 78,5 | 63,5 | 83,7                  | 52,3 | 36,9 |
| F-3                                     | 73   | 98   | 97,9                  | 8,2  | 6,7  |
| F-4                                     | 93,5 | 69   | 77,7                  | 22,3 | 23,4 |
| Protocolo H14s9/WNT                     |      |      | Protocolo Shef3.2/FGF |      |      |
| Resultado específico de protocolo/línea |      |      |                       |      |      |

Figura 4c

| Protocolo H14s9/WNT |             |      | Protocolo Shef3.2/FGF |      |      |
|---------------------|-------------|------|-----------------------|------|------|
|                     | % Positivos |      |                       |      |      |
|                     | 1           | 2    | 3                     | 4    | 5    |
| Pocillo             |             |      |                       |      |      |
| B-9                 | 74,8        | 82,4 | 53,6                  | 66,5 | 2,8  |
| C-8                 | 99,8        | 95,8 | 97,4                  | 4,3  | 21,6 |
| C-11                | 95,7        | 85,3 | 89,7                  | 34,8 | 29,1 |
| C-12                | 71,3        | 53,5 | 75                    | 80,1 | 11   |
| CD15                |             |      |                       |      |      |
| GD2                 |             |      |                       |      |      |
| SSEA1               |             |      |                       |      |      |
| SSEA4               |             |      |                       |      |      |

Figura 5

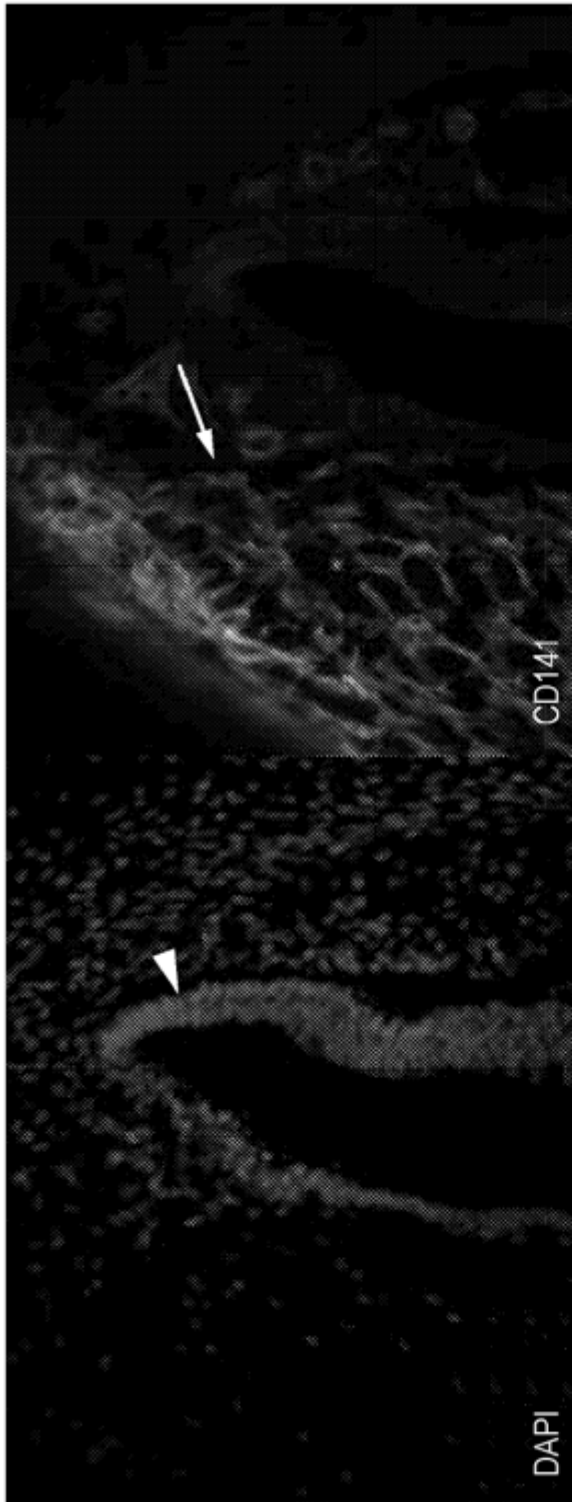


Figura 6

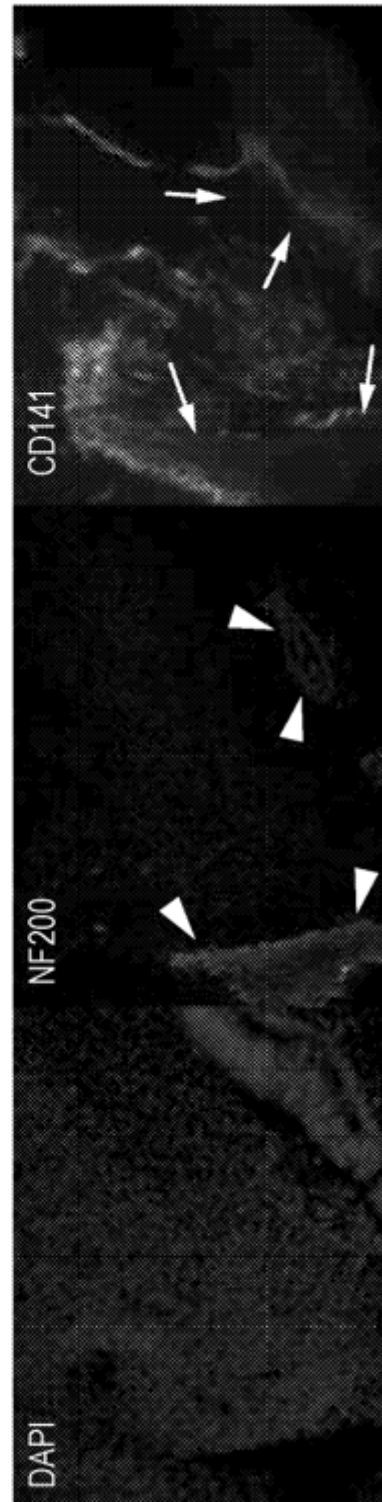


Figura 7

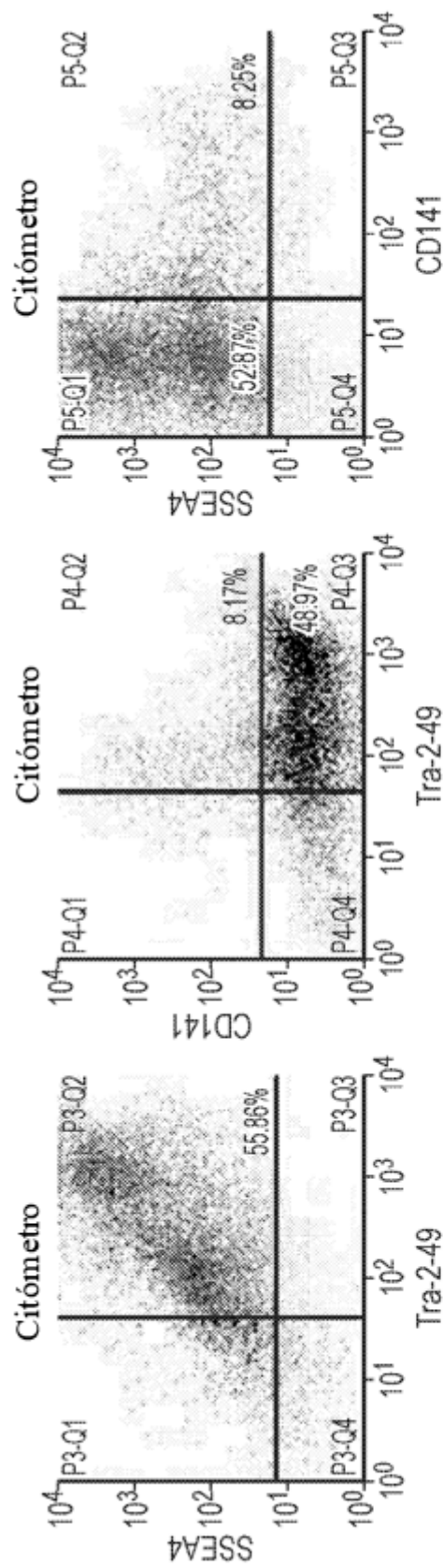


Figura 8a

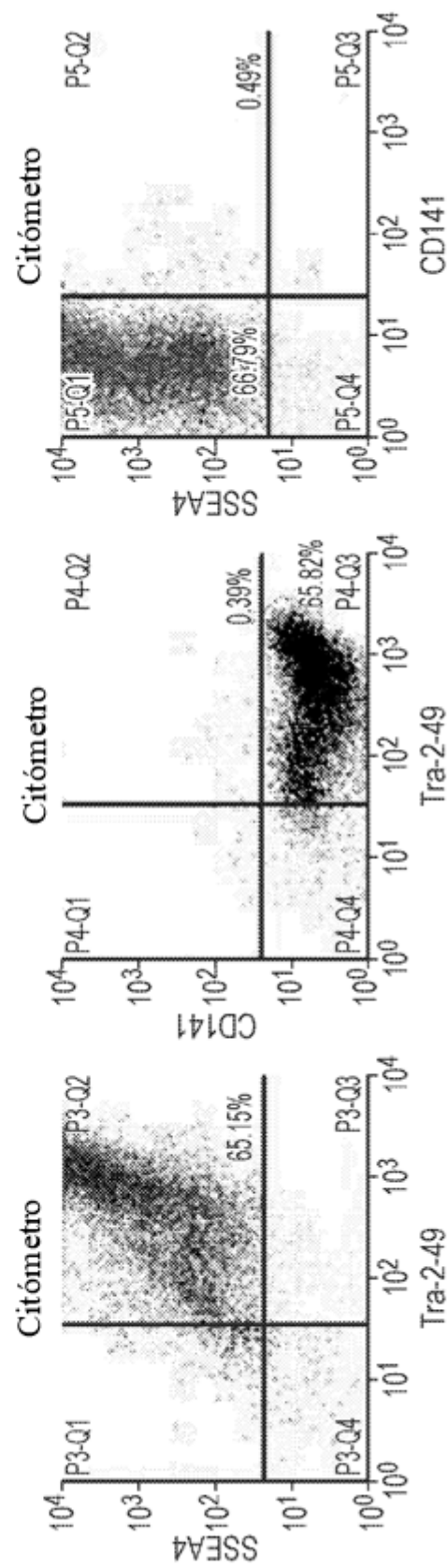


Figura 8b

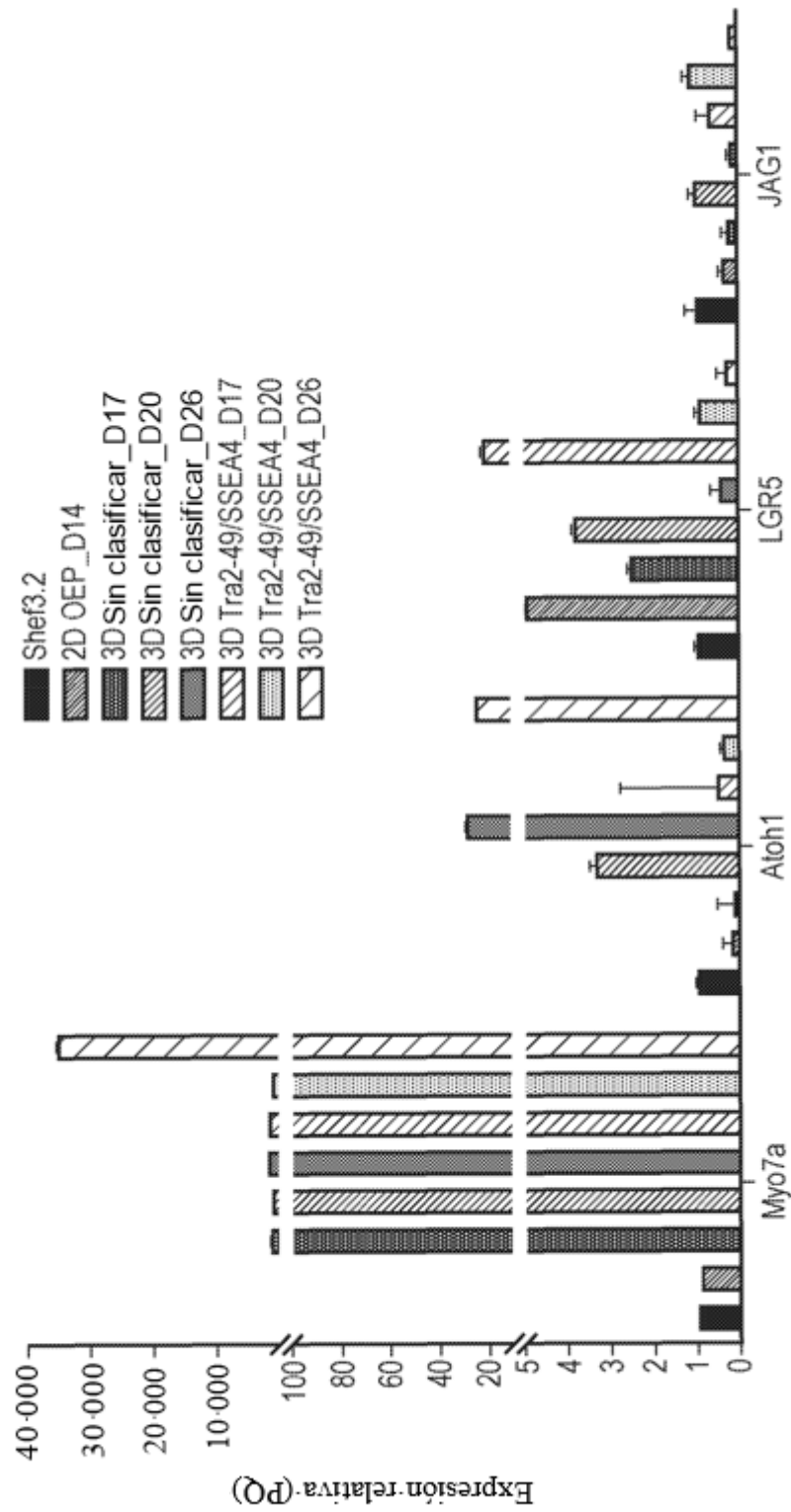


Figura 9