



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/56966 (2022.01); C12N 5/0602 (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2019110990, 14.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.09.2017

Дата регистрации:
24.03.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.09.2016 GB 1615714.1

(43) Дата публикации заявки: 15.10.2020 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 24.03.2022 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.04.2019

(86) Заявка РСТ:
GB 2017/052707 (14.09.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/051092 (22.03.2018)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

РИВОЛТА, Карлос Марсело Николас (GB),
БОДДИ, Сара Луис (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ШЕФФИЛД
(GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: KERR C.L. et al., Expression of
pluripotent stem cell markers in the human fetal
testis, Stem Cells. 2008 Feb;26(2):412-421; DOI:
10.1634/stemcells.2007-0605. WO 2013123292 A1,
22.08.2013. BODDY S. et al., Inner ear progenitor
cells can be generated in vitro from human bone
marrow mesenchymal stem cells, Reg Med Future
Med. 2012; 7(6):757-767; (см. прод.)

(54) ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СЛУХОВЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к клеточной биологии и медицине, в частности к способам идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток, способу обогащения предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток, а также способу получения популяции предшественников слуховых клеток. Для осуществления заявленных способов определяют, содержит ли клетка по меньшей мере два

поверхностных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141, в котором клеточные маркеры SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 и GD2 являются положительными клеточными маркерами, и в котором клеточный маркер CD141 является отрицательным клеточным маркером. Настоящее изобретение позволяет идентифицировать и выделять слуховые клетки из смешанной культуры клеток. 4 н. и 14 з.п. ф-лы, 12 ил., 4 табл., 1 пр.

R U 2 7 6 8 7 2 0 C 2

R U 2 7 6 8 7 2 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/56966 (2022.01); *C12N 5/0602* (2022.01)(21)(22) Application: **2019110990, 14.09.2017**

(24) Effective date for property rights:
14.09.2017

Registration date:
24.03.2022

Priority:

(30) Convention priority:
15.09.2016 GB 1615714.1

(43) Application published: **15.10.2020 Bull. № 29**(45) Date of publication: **24.03.2022 Bull. № 9**(85) Commencement of national phase: **15.04.2019**

(86) PCT application:
GB 2017/052707 (14.09.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/051092 (22.03.2018)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**RIVOLTA, Carlos Marcelo Nicolas (GB),
BODDY, Sarah Louise (GB)**

(73) Proprietor(s):

THE UNIVERSITY OF SHEFFIELD (GB)(54) **IDENTIFICATION AND ISOLATION OF HUMAN AUDITORY CELL PRECURSORS**

(57) Abstract:

FIELD: cell biology; medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to methods for identifying precursors of human auditory cells in a mixed population of cells, a method of enriching human auditory cell precursors from a mixed population of cells, as well as a method of producing a population of auditory cell precursors. To implement the disclosed methods, it is determined whether a cell contains at

least two surface markers selected from SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 and CD141, in which cell markers SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 and GD2 are positive cell markers, and in which the cell marker CD141 is a negative cell marker.

EFFECT: present invention enables to identify and isolate auditory cells from a mixed cell culture.

18 cl, 12 dwg, 4 tbl, 1 ex

Настоящее изобретение, в основном, относится к идентификации и выделению предшественников слуховых клеток человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу применения клеточных маркеров для идентификации и выделения предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток, к способам обогащения и получения предшественников слуховых клеток человека, и к связанным с ними наборам для применения для идентификации и/или выделения.

Глухота представляет собой состояние, широко распространенное во всем мире, которое первично вызвано потерей сенсорных волосковых клеток и связанных с ними нейронов спирального ганглия (SGN). Из всех форм глухоты особую озабоченность вызывает слуховая нейропатия. Это состояние, определяемое в первую очередь повреждением SGN с относительной сохранностью волосковых клеток, является причиной нарушения слуха у существенной доли пациентов. Хотя потерю волосковых клеток можно частично обойти при помощи кохлеарного имплантата, для утраты сенсорных нейронов не существует стандартного лечения, поскольку слабая иннервация ограничивает предполагаемую эффективность имплантата. Потенциальной стратегией для терапии является использование стволовых клеток для восстановления поврежденной сенсорной сети.

Были разработаны протоколы для того чтобы индуцировать дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК) при помощи сигналов, таких как FGF3 и FGF10, участвующих в начальной специализации статоакустической плакоды (Chen et al. 2012. *Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors*. Nature, 490(7419):278-82. doi: 10,1038/nature11415). Индуцированные предшественники слуховых клеток способны дифференцироваться *in vitro* в клетки, подобные волосковым клеткам, и слуховые нейроны, которые демонстрируют ожидаемые электрофизиологические свойства. Кроме того, при трансплантации в модель со слуховой нейропатией предшественники слуховых клеток прививаются, дифференцируются и значительно улучшают пороги слуховых вызванных потенциалов. Однако, применяемый способ индуцирования при помощи FGF3/10 неэффективен, т.к. он дает приблизительно только 20% требуемых типов клеток.

Если предшественники слуховых клеток, полученные из эмбриональных стволовых клеток человека (чЭСК), должны использоваться в клинических условиях, необходимо, чтобы эти клетки были выделены из других типов клеток, самопроизвольно образующихся в процессе дифференцировки. Общепринятым способом для выделения компонента клеточной популяции из гетерогенных культур является активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS), но при использовании этого способа необходимо идентифицировать специфические маркеры клеточной поверхности, которые связываются с ключевым типом клеток, например, предшественниками слуховых клеток. Хотя был описан ряд маркеров для выделения характерных нейральных клеток-предшественников, не был выявлен ни один маркер для выделения предшественников слуховых клеток человека (либо нейральных, либо эпителиальных).

Целью настоящего изобретения является создание способа идентификации и потенциального выделения предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток с использованием по меньшей мере двух поверхностных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1 (также известного, как CD15 или Lewis X), GD3, TRA-2-49

(щелочной фосфатазы), SSEA4, GD2 и CD141.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток, включающий определение того, имеет ли клетка по меньшей мере два
5 поверхностных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток, включающий определение того, имеет ли клетка по меньшей мере два
10 поверхностных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141,

где клетки, которые были идентифицированы, как имеющие:

- а) по меньшей мере, два из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 или GD2; или
- б) по меньшей мере, один из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2, но не CD141,
15 идентифицируются как предшественники слуховых клеток человека.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток с использованием по меньшей мере двух поверхностных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1 (также известного, как CD15), GD3, TRA-2-49 (щелочной
20 фосфатазы), SSEA4, GD2 и CD141, включающий:

- обеспечение связывающих элементов, специфичных по меньшей мере для двух различных клеточных маркеров (т.е. по меньшей мере двух различных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1 (также известного как CD15), GD3, TRA-2-49 (щелочной фосфатазы), SSEA4, GD2 и CD141);

- контакт смешанной популяции клеток со связывающими элементами; и
- выявление связывания или отсутствия связывания связывающих элементов с клетками в смешанной популяции клеток.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ обогащения предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции
30 клеток, включающий:

- идентификацию предшественников слуховых клеток человека в соответствии с изобретением в настоящем документе; и
- сортировку клеток таким образом, что предшественники слуховых клеток человека отделены от предшественников не-слуховых клеток, и, таким образом, обогащение
35 популяции предшественниками слуховых клеток человека.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ получения популяции предшественников слуховых клеток человека, включающий:

- дифференцировку предшественников не-слуховых клеток в предшественники слуховых клеток человека, при этом некоторые предшественники не-слуховых клеток
40 могут оставаться в популяции, формируя смешанную популяцию клеток; и
- обогащение предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток в соответствии со способом по изобретению в настоящем документе.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается набор, содержащий по меньшей мере два различных связывающих элемента, где связывающие
45 элементы выполнены с возможностью связывания с различными клеточными маркерами, выбранными из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается применение CD141 в качестве отрицательного клеточного маркера для выявления предшественников

не-слуховых клеток в смешанной популяции клеток.

Предпочтительно, клеточные маркеры SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141 были идентифицированы при помощи нескольких раундов скрининга с использованием панели антител к клеточной поверхности на двух различных линиях эмбриональных стволовых клеток человека, дифференцированных в предшественников слуховых клеток с использованием двух различных способов. С использованием объективных количественных порогов экспрессии и количественного морфологического анализа морфологии предшественников слуховых клеток были выбраны нижеописанные маркеры, которые определяли правильный тип клеток. Кроме того, CD141 был идентифицирован в качестве отрицательного маркера, т.е. он отмечает клетки, которые не являются предшественниками слуховых клеток. Протеом клеточной поверхности предшественников слуховых клеток, полученных из плюрипотентной стволовой клетки человека, был охарактеризован при помощи антител, которые можно использовать в проточной цитометрии и сортировке клеток с активированной флуоресценцией (FACS) для того чтобы очистить их от гетерогенных популяций, полученных из дифференцирующихся плюрипотентных стволовых клеток. Выделение и очистка могут а) улучшать непосредственное применение для клеточной терапии за счет лучшего определения соответствующего типа клеток и удаления потенциально опасных клеток и б) улучшить анализы *in vitro* для скрининга лекарственных средств и токсичность за счет удаления клеток, которые могут иметь искажающий эффект. Кроме того, эти маркеры должны быть очень полезны для очистки предшественников слуховых клеток для того чтобы: 1) заставить их дифференцироваться дальше или в сенсорные волосковые клетки, или в нейроны. Это должно сделать протоколы дифференцировки более эффективными, облегчая масштабирование получения для высокопроизводительного скрининга лекарственных средств; и 2) выбрать подходящий тип клеток для клеточной трансплантационной терапии, сводя к минимуму загрязнение нежелательными типами клеток и снижая потенциальные риски терапии из-за развития побочных эффектов.

Краткое описание чертежей:

Фигура 1 - индуцирование чЭС клеток в направлении дифференцировки в предшественники слуховых клеток проводили путем индуцирования передачи сигнала FGF при помощи FGF3 и FGF10. Улучшенный выход предшественников получали за счет добавления WNT-инактивации в течение первых девяти суток, с последующей WNT-инактивацией в течение 3 суток с одновременным снижением концентрации FGF3 и FGF10.

Фигура 2 - точечные диаграммы, полученные из интенсивностей флуоресценции отдельных клеток (данные планшета 1), уровней GFP из эндогенного репортера на оси x и Alexa 568 из вторичных антител, нацеленных на поверхностный клеточный маркер, на оси y.

Фигура 3 - объединенные изображения GD3 (красный), PAX2 (зеленый) и Hoechst (голубой). Стрелки указывают: PAX2+/GD3- колония с морфологией нейтрального предшественника слуховых клеток, PAX2+/GD3+ - колония эпителиальных предшественников слуховых клеток и PAX2-/GD3+ клетки, которые не являются предшественниками слуховых клеток на основании морфологии.

Фигура 4a - выделенные лунки не считали потенциальными попаданиями, т.е. они находились ниже порога.

Фигура 4b - выделенные лунки не считали потенциальными попаданиями, т.е. они находились ниже порога.

Фигура 4c - антитело, соответствующее лунке F-3, связалось только с клетками линии

H14s9, которые были обработаны IWR-1 и BIO. Поскольку оно не являлось универсальным для обеих линий и протоколов, оно далее не рассматривалось в качестве кандидата.

Фигура 5 - процентное содержание отобранных маркеров, выявленное при скрининге BD Lyoplate. SSEA1 был представлен дважды (в виде меченого антителом H198 как CD15- и в виде меченого антителом MC480 как SSEA1). GD3 и TRA-2-49/6E не были представлены в BD Lyoplates и выбраны только из нашей исходной небольшой панели.

Фигура 6 - срез 13-недельного человеческого канала улитки, окрашенный по CD141. CD141-положительные клетки (стрелка) расположены вне эпителия, который содержит предшественники слуховых клеток (наконечник стрелки).

Фигура 7 - срез 8-недельного канала улитки, показывающий окрашивание по CD141 и нейрофиламенту (NF200). CD141 метит клетки, окружающие эпителий улитки, но исключает NF200-положительные нейробласты (наконечники стрелки на срезе с окраской по NF200, стрелки на срезе с окраской по CD141).

Фигура 8a и 8b - чЕСК подвергали дифференцировке в предшественники слуховых клеток и окрашивали по SSEA4, Tra-2-49 и CD141. (A) и (B) показывают два независимых эксперимента. SSEA4 и TRA-2-49 сгруппированы в одной и той же клеточной популяции (левая колонка) ((A) P3-Q2 55,86%; (B) P3-Q2 65,15%), в то время как SSEA4/TRA-2-49-положительные клетки являются CD141-отрицательными ((A) P4-Q3 48,97%, P5-Q1 52,87%; (B) P4-Q3 65,82%, P5-Q1 66,79%). (A) и (B) показывают более предельные примеры, с CD141-положительными клетками в диапазоне от ~0,3 до ~8% ((A) P4-Q2 8,17%, P5-Q2 8,25%; (B) P4-Q2 0,39%, P5-Q2 0,49%).

Фигура 9 - чЕСК подвергали дифференцировке в предшественники слуховых клеток в течение 14 суток, и сортировали по SSEA4/TRA2-49. Дважды положительным клеткам затем позволяли дифференцироваться в течение 17, 20 и 26 суток в клетки, подобные волосковым клеткам, с использованием органоидной (3D) системы культивирования, разработанной в нашей лаборатории. Дифференцировку в клетки, подобные волосковым клеткам, также можно проводить при помощи опубликованного способа (например, Koehler et al., 2017). Несортированные клетки также подвергали дифференцировке отдельно для сравнения, и образцы анализировали путем количественной ПЦР. Маркеры волосковых клеток Myo7a и Atoh1 имели повышенный уровень экспрессии в сортированной популяции через 26 суток 3D-культивирования. LGR5, маркер стволовых клеток и поддерживающих клеток, имел повышенный уровень экспрессии в незрелых предшественниках перед сортировкой, и на ранних стадиях дифференцировки, в основном, в образцах несортированных клеток. JAG1, маркер поддерживающих клеток, не имел повышенного уровня экспрессии.

Подробное описание

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток с использованием по меньшей мере двух поверхностных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1 (также известного, как CD15 или Lewis X), GD3, TRA-2-49 (щелочной фосфатазы), SSEA4, GD2 и CD141.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток, включающий определение того, имеет ли клетка по меньшей мере два поверхностных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ

идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток, включающий определение того, имеет ли клетка по меньшей мере два поверхностных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141,

5 где клетки, которые были идентифицированы, как имеющие:

- а) по меньшей мере два из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 или GD2; или
- б) по меньшей мере один из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2, но не CD141, идентифицируются как предшественники слуховых клеток человека.

В одном из вариантов осуществления клеточные маркеры SSEA1, GD3, TRA-2-49, 10 SSEA4 и GD2 представляют собой положительные клеточные маркеры, и CD141 представляет собой отрицательный клеточный маркер. Соответственно, способы включают измерение положительных клеточных маркеров. Соответственно, способы включают измерение отрицательных клеточных маркеров. Способы могут также включать измерение положительных и отрицательных клеточных маркеров.

15 Применение поверхностных клеточных маркеров, как описано в настоящем документе, может включать их применение на этапе идентификации/определения. В частности, определения того присутствует или не присутствует поверхностный клеточный маркер на клетке, или присутствует или не присутствует на группе клеток. Положительные клеточные маркеры можно использовать в комбинации друг с другом 20 для идентификации человеческих предшественников слуховых клеток, например, по меньшей мере в парах положительных маркеров (т.е. два или более положительных маркеров). В другом варианте осуществления по меньшей мере три из положительных клеточных маркеров применяют в комбинации. В другом варианте осуществления по меньшей мере четыре из положительных клеточных маркеров применяют в комбинации. 25 В другом варианте осуществления все пять (т.е. пять из) положительных клеточных маркеров из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, и GD2 применяют для идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток.

Положительные клеточные маркеры также можно использовать в комбинации с отрицательным клеточным маркером CD141. В одном из вариантов осуществления по 30 меньшей мере один (т.е. один из) положительный клеточный маркер, выбранный из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 и GD2, применяют в комбинации с отрицательным клеточным маркером CD141. В другом варианте осуществления по меньшей мере два (т.е. два из) положительных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 и GD2, применяют в комбинации с отрицательным клеточным маркером CD141. 35 В другом варианте осуществления по меньшей мере три (т.е. три из) положительных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 и GD2, применяют в комбинации с отрицательным клеточным маркером CD141. В другом варианте осуществления по меньшей мере четыре (т.е. четыре из) положительных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 и GD2, применяют в комбинации 40 с отрицательным клеточным маркером CD141. В другом варианте осуществления все пять (т.е. пять из) положительных клеточных маркеров из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, и GD2 применяют в комбинации с отрицательным клеточным маркером CD141.

Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по 45 меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих SSEA1 и GD3. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих SSEA1 и GD3, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров,

включающих SSEA1 и TRA-2-49. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих SSEA1 и TRA-2-49, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих SSEA1 и SSEA4. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих SSEA1 и SSEA4, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих SSEA1 и GD2. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих SSEA1 и GD2, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих GD3 и TRA-2-49. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих GD3 и TRA-2-49, и отрицательного клеточного маркера маркер CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих GD3 и SSEA4. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих GD3 и SSEA4, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих GD3 и GD2. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих GD3 и GD2, и отрицательного клеточного маркера CD141.

Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих TRA-2-49 и SSEA4. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих TRA-2-49 и SSEA4, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих TRA-2-49 и GD2. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих TRA-2-49 и GD2, и отрицательного клеточного маркера CD141. Способ может включать применение по меньшей мере двух клеточных маркеров по меньшей мере двух клеточных маркеров, включающих SSEA4 и GD2. Способ может включать применение по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров по меньшей мере двух положительных клеточных маркеров, включающих SSEA4 и GD2, и отрицательного клеточного маркера CD141.

Применение клеточных маркеров в комбинации может происходить при идентификации одновременно (по существу, в одно и то же время), или последовательно (в различные моменты времени/на различных этапах). В одном из вариантов осуществления применение клеточных маркеров в комбинации является одновременным, например, при FACS и/или MACS.

Смешанная популяция клеток иначе может быть обозначена как гетерогенная клеточная популяция. Смешанная популяция клеток может находиться *in vitro*. Способ по изобретению может проводиться *in vitro*. В одном из вариантов осуществления

смешанную популяцию клеток можно получать из протокола или во время протокола дифференцировки стволовых клеток (таких как чЭСК или любых других плюрипотентных стволовых клеток, таких как ИПСК) *in vitro*. В другом варианте осуществления смешанную популяцию клеток можно получать из способов или во время способов де-дифференцировки, транс-дифференцировки или прямого перепрограммирования в человеческие клеточные линии слуховых клеток.

В другом варианте осуществления смешанные популяции клеток можно получать из ткани, например, из биопсии. Источником предшественников слуховых клеток человека может быть любая ткань, известная специалисту в данной области, включая в качестве неограничивающих примеров ткани внутреннего уха развивающегося плода, и образцы преддверия и улитки, полученные при хирургических вмешательствах, из внутреннего уха взрослых людей.

Смешанные популяции клеток могут быть клетками млекопитающих. В одном из вариантов осуществления клетки смешанной популяции клеток являются человеческими клетками.

Дополнительный вариант осуществления способа можно использовать для идентификации предшественников слуховых клеток человека *in vivo*, например, после операции во время или после лечения с пересадкой клеток.

Способ идентификации может включать нацеливание на клеточные маркеры при помощи связывающего элемента, который можно детектировать, например, можно выявлять связывание связывающего элемента с клеточным маркером. Смешанную популяцию клеток можно приводить в контакт с одним или несколькими связывающими элементами, способными связываться (альтернативно, выполненными со способностью связываться) с клеточными маркерами.

Связывающий элемент может предпочтительно связываться с клеточным маркером, описываемым в настоящем документе, или иным образом быть специфичным для клеточного маркера, описываемого в настоящем документе. Связывающий элемент может содержать антитело, фрагмент антитела или его миметик.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA1 содержит антитело HI98 или 480-1-1. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA1 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом HI98 или 480-1-1. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA1 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело HI98 или 480-1-1. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA1 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело HI98 или 480-1-1. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA1 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело HI98 или 480-1-1.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA4 содержит антитело MC-813-70. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA4 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом MC-813-70. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA4 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело MC-813-70. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания

с SSEA4 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело MC-813-70. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с SSEA4 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело MC-813-70.

5 В одном из вариантов осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с TRA-2-49 содержит антитело TRA-2-49/6E. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с TRA-2-49 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом TRA-2-49/6E. В другом варианте осуществления связывающий
10 элемент для идентификации/связывания с TRA-2-49 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело TRA-2-49/6E. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с TRA-2-49 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело TRA-2-49/6E. В другом варианте осуществления связывающий элемент для
15 идентификации/связывания с TRA-2-49 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело TRA-2-49/6E.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD2 содержит любое из антител 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 или PB22. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания
20 с GD2 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с любым из антител 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 или PB22. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD2 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и любое из антител 14.18, DMab-20,
25 14G2a, VIN 2 или PB22. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD2 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и любое из антител 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 или PB22. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD2 может содержать антитело с теми же CDR, что и любое из антител 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN
30 2 или PB22.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD3 содержит антитело DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD3 может
35 содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD3 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент
40 для идентификации/связывания с GD3 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с GD3 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело DMab-7 или VINIS56.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с CD141 содержит антитело 1A4. В другом варианте осуществления
45 связывающий элемент для идентификации/связывания с CD141 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с CD141 может содержать такой связывающий элемент, как

антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с CD141 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент для идентификации/связывания с CD141 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело 1A4.

Клеточные маркеры и антитела, выполненные со способностью связываться с клеточными маркерами, могут быть дополнительно описаны и идентифицированы в следующих публикациях, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки.

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 S-i, 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) и (Durbas M, Horwacik I, Boratyn E, Kamyska 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 S-i, 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) и (Stuhlmiller GM1, Roberson KM, Seigler HF., Serological response of non-human primates to human melanoma disialoganglioside GD3. *Cancer Immunol Immunother.* 1989;29(3):205-10).

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).

Как применяют в настоящем документе термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, т.е. молекулам, которые содержат антигенсвязывающий участок, специфически связывающийся с антигеном, и которые получены природным или частично или полностью синтетическим путем. Термин также включает любой полипептид или белок со связывающим доменом, который является связывающим доменом антитела или гомологичен ему. Они могут быть получены из природных источников, или они могут быть частично или полностью получены синтетическим путем. Примерами антител являются изотипы иммуноглобулинов (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) и их изотипические подклассы; фрагменты, которые содержат антигенсвязывающий домен, такие как Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; и диатела. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными. Моноклональное антитело может быть обозначено как «мАТ».

Поскольку антитела можно модифицировать множеством путей, термин «антитело» следует понимать, как включающий участника специфического связывания или вещество со связывающим доменом с необходимой специфичностью. Таким образом, этот термин включает фрагменты антител, производные, функциональные эквиваленты, миметики

и гомологи антител, гуманизированные антитела, включая любой полипептид, содержащий связывающий домен иммуноглобулина, природный или частично или полностью синтетический. Таким образом, включены химерные молекулы, содержащие связывающий домен иммуноглобулина, или эквивалент, слитый с другим полипептидом.

5 Миметик антител может включать аффитело.

Показано, что фрагменты целого антитела могут выполнять функцию связывания с антигенами. Примерами связывающих фрагментов являются (i) фрагмент Fab, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одиночного антитела; (iv) 10 фрагмент dAb, который состоит из домена VH; (v) выделенные области CDR; (vi) фрагменты F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab; и (vii) одноцепочечные молекулы Fv (scFv), где домен VH и домен VL связаны пептидным линкером, который позволяет двум доменам ассоциироваться для формирования антигенсвязывающего участка.

15 Способ по изобретению может включать этап детекции, где выявляется присутствие или отсутствие клеточных маркеров на клетке или группе клеток.

Специалисту будет очевидно, что существует ряд способов для выявления связывания связывающих элементов, таких как антитела, с поверхностным клеточным маркером. Такой способ может включать мечение связывающего элемента детектируемой меткой/ 20 маркировкой или использование вторичного связывающего элемента, такого как антитело, которое является меченым или маркированным и способно специфически связываться с «первичным» связывающим элементом, связанным с клеточным маркером.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент является меченным (или иным образом маркированным) для идентификации. После того как меченый 25 связывающий элемент связался с клеточным маркером, клетку можно называть «меченая клетка». Можно использовать различные метки для маркировки каждого вида связывающего элемента, выполненного с возможностью связывания с клеточным маркером. Метка может содержать любую из радиоактивной метки, ферментативной метки, магнитной метки, аффинной метки (такой как биотин или авидин), или 30 детектируемой метки со световым излучением, такой как флуорофор или хромофор; или их сочетания. Метка может быть конъюгирована со связывающим элементом, например, при помощи ковалентного связывания.

Флуорофор может быть в форме флуоресцентных белков, таких как GFP (зеленый), YFP (желтый) или RFP (красный). Альтернативно, флуорофор может быть небелковым 35 органическим флуорофором. Флуорофоры, которые могут быть использованы в качестве меток, могут содержать любую из групп, выбранных из производных ксантена, таких как флуоресцеин, родамин, орегонский зеленый, эозин и техасский красный; производных цианина, таких как цианин, индокарбоцианин, оксакарбоцианин, тиаккарбоцианин и мероцианин; производных скварена и замещенных в кольце скваренов, 40 включая краски Seta, SeTau и Square; производных нафталина (производные дансила и продана); производных кумарина; производных оксадиазола, таких как пиридилоксазол, нитробензохадиазол и бензохадиазол; производных антрацена, таких как антрахиноны, включая DRAQ5, DRAQ7 и CyTRAK оранжевый; производных пирена, таких как Cascade blue; производных оксазина, таких как нильский красный, нильский синий, крезиловый 45 фиолетовый и оксазин 170; производных акридина, таких как профлавин, акридиновый оранжевый, акридиновый желтый, кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый; и производных тетрапиррола, таких как порфин, фталоцианин и билирубин.

Различные флуорофоры можно использовать для мечения разных видов

связывающего элемента, выполненного с возможностью связывания с клеточным маркером. Каждый флуорофор имеет характерные пик возбуждения и длину волны испускания, которые можно детектировать. Вместо традиционных флуорофоров можно использовать квантовые точки.

5 Альтернативным связывающим элементом для антител могут быть аптамеры, короткие нуклеотидные последовательности, которые могут распознавать специфические домены белка. Поскольку аптамеры имеют небольшой размер и меняют конформацию после связывания со своей мишенью, можно конструировать их таким образом, что специфическое связывание высвобождает гаситель или создает пару FRET, которые
10 можно детектировать.

Детекцию меченых клеток можно проводить любым подходящим анализом, который может включать использование любой группы, включающей иммунологические анализы, спектрометрию, вестерн-блоттинг, ELISA, иммунопреципитацию, слот или дот-блот анализ, изоэлектрофокусирование, SDS-PAGE и иммуногистологическое
15 окрашивание микропанелью антител, радиоиммунный анализ (RIA), флуоресцентный иммунный анализ, иммунологический анализ с использованием системы авидин-биотин или стрептоавидин-биотин, и т.п. или их сочетания. Эти способы хорошо известны специалистам в данной области. Некоторые способы детекции могут требовать разрушения клеток. В некоторых вариантах осуществления способ детекции не требует
20 разрушения клетки. Например, детекция может включать микроскопию, такую как конфокальная и/или флуоресцентная микроскопия, для идентификации меченых клеток. Детекция может включать использование FACS (активируемая флуоресценцией сортировка клеток) или MACS (сортировка клеток с магнитной активацией). В одном из вариантов осуществления детекция включает использование FACS.

25 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток с использованием по меньшей мере двух поверхностных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1 (также известного, как CD15), GD3, TRA-2-49 (щелочной фосфатазы), SSEA4, GD2 и CD141, включающий:

- 30 - обеспечение связывающих элементов, специфичных по меньшей мере для двух различных клеточных маркеров (т.е. по меньшей мере двух различных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1 (также известного как CD15), GD3, TRA-2-49 (щелочной фосфатазы), SSEA4, GD2 и CD141);
- контакт смешанной популяции клеток со связывающими элементами; и
- 35 - выявление связывания или отсутствия связывания связывающих элементов с клетками в смешанной популяции клеток.

Способ может дополнительно включать определение того, что клетка является человеческим предшественником слуховых клеток, если:

- а) связывающие элементы, выполненные с возможностью связывания с
40 положительными клеточными маркерами, связываются по меньшей мере с двумя различными положительными клеточными маркерами на клетке; или
- б) связывающий элемент, выполненный с возможностью связывания с одним из положительных клеточных маркеров, связывается по меньшей мере с одним из положительных клеточных маркеров на клетке, и связывающий маркер, выполненный
45 с возможностью связывания с отрицательным клеточным маркером CD141, не связывается с клеткой.

В другом варианте осуществления способ может дополнительно включать определение того, что клетка является человеческим предшественником слуховых

клеток, если:

а) связывающие элементы, выполненные с возможностью связывания с положительными клеточными маркерами, связываются по меньшей мере с тремя различными положительными клеточными маркерами на клетке; или

б) связывающие элементы, выполненные с возможностью связывания по меньшей мере с двумя различными положительными клеточными маркерами, связываются по меньшей мере с двумя различными положительными клеточными маркерами на клетке, и связывающий маркер, выполненный с возможностью связывания с отрицательным клеточным маркером CD141, не связывается с клеткой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ обогащения предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток, включающий:

- идентификацию предшественников слуховых клеток человека в соответствии с изобретением в настоящем документе; и

- сортировку клеток таким образом, что предшественники слуховых клеток человека отделены от предшественников неслуховых клеток, и, таким образом, обогащение популяции предшественниками слуховых клеток человека.

В одном из вариантов осуществления выделение предшественников слуховых клеток человека может быть полным (т.е. 100% выделение из предшественников не-слуховых клеток). В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 20% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 15% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 10% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 8% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 5% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 3% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 2% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 1% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 0,1% предшественников не-слуховых клеток. В другом варианте осуществления предшественники слуховых клеток человека можно обогащать таким образом, что в популяции присутствует менее чем 0,01% предшественников не-слуховых клеток.

Обогащение можно проводить после однократного раунда сортировки.

Альтернативно, можно проводить несколько раундов сортировки, например, для дополнительного обогащения или чтобы обеспечить более высокий процент предшественников слуховых клеток человека в популяции.

Предшественники не-слуховых клеток можно выбрасывать, уничтожать, изолировать

или иным образом содержать отдельно от предшественников слуховых клеток человека.

В одном из вариантов осуществления процесс обогащения поддерживает жизнеспособность предшественников слуховых клеток человека.

В одном из вариантов осуществления сортировку проводят путем FACS. В другом варианте осуществления обогащение и сортировку предшественников слуховых клеток человека проводят путем использования по меньшей мере одной аффинной колонки. Альтернативно, способ можно проводить при помощи магнитных гранул, которые селективно связывают предшественников слуховых клеток человека. В другом варианте осуществления обогащение и сортировку предшественников слуховых клеток человека проводят путем использования MACS.

Благодаря использованию FACS обеспечивается преимущество, состоящее в обогащении и сортировке клеток с высокой точностью и в уменьшении необходимости проведения нескольких раундов сортировки, поскольку FACS позволяет использовать несколько различных флуорофорных меток и, таким образом, проводить одновременный отбор по нескольким клеточным маркерам.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается способ получения популяции предшественников слуховых клеток человека, включающий:

- дифференцировку, де-дифференцировку, транс-дифференцировку и прямое перепрограммирование популяции предшественников не-слуховых клеток в предшественники слуховых клеток человека, при этом некоторые предшественники не-слуховых клеток могут оставаться в популяции, формируя смешанную популяцию клеток; и

- обогащение предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток в соответствии со способом по изобретению в настоящем документе.

Дифференцировка популяции предшественников не-слуховых клеток может включать дифференцировку популяции стволовых клеток, таких как чЭСК или ИПСК. Например, предшественники не-слуховых клеток могут включать стволовые клетки, такие как чЭСК или ИПСК. Де-дифференцировка популяции предшественников не-слуховых клеток может включать де-дифференцировку популяции более зрелых клеток. Например, предшественники не-слуховых клеток могут включать зрелые (полностью дифференцированные) клетки. Транс-дифференцировка или прямое перепрограммирование популяции предшественников не-слуховых клеток может включать транс-дифференцировку или прямое перепрограммирование популяции клеток из отличающейся линии (т.е. линии не-слуховых клеток).

Специалисту в данной области известно множество средств для дифференцировки, которые могут дифференцировать стволовые клетки в конкретные типы клеток, такие как предшественники слуховых клеток. Таким образом, предполагается, что стволовые клетки могут быть дифференцированы в предшественники слуховых клеток любыми способами, известными специалисту в данной области. Некоторые примеры средств для дифференцировки, в качестве неограничивающих примеров включают лиганды FGF, ингибирование и активацию WNT, IGF1, ингибирование и активацию TGF, эмбриональную телячью сыворотку, фактор роста нервов, удаление EGF, удаление bFGF (или обоих), BDNF, гормон щитовидной железы, BMPs, LIF, путь sonic hedgehog, GDNFs, VEGFs, интерлейкины, интерфероны, SCF, активины, ингибины, хемокины, ретиноевую кислоту и CNTF.

Дифференцировку неограничивающим образом можно проводить в соответствии с протоколом, описанным Chen *et al.* (2012. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature*, 490(7419):278-82. doi: 10.1038/nature11415), или

Ronaghi *et al.* (2014. *Stem Cells Dev*, 23(11), 1275-1284), которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Например, дифференцировка может включать индуцирование предшественников слуховых клеток из эмбриональных стволовых клетки человека (ЧЭСК) с использованием сигналов, участвующих в начальной специализации слуховой плакоды. В частности, дифференцировка может включать индуцирование FGF (фактор роста фибробластов) при помощи FGF3 и FGF10, необязательно, где концентрация каждого из FGF3 и FGF10 приблизительно составляет 50 нг/мл. Дифференцировка может включать этапы, описанные на фигуре 1a в настоящем документе или Chen *et al.* 2012. Альтернативно, дифференцировка может включать индуцирование FGF при помощи FGF3 и FGF10 и воздействие на передачу сигнала WNT путем ингибирования WNT с последующим индуцированием WNT (см. фигуру 1b в настоящем документе). Дифференцировка может включать этапы, описанные на фигуре 1b в настоящем документе.

Предполагается, что предшественники не-слуховых клеток могут быть стволовыми клетками из любого известного источника, эмбриональной (фетальной) ткани или постэмбриональной ткани. В одном из вариантов осуществления предшественники не-слуховых клеток для дифференцировки включают или содержат плюрипотентные стволовые клетки, такие как эмбриональные стволовые клетки человека (чЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Предшественники не-слуховых клеток могут содержать фетальные клетки. В другом варианте осуществления предшественники не-слуховых клеток могут содержать стволовые клетки из других тканей, таких как мезенхимальная ткань, жировая ткань или другие ткани.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается набор, содержащий по меньшей мере два различных связывающих элемента, где связывающие элементы выполнены с возможностью связывания с различными клеточными маркерами, выбранными из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В одном из вариантов осуществления набор может содержать по меньшей мере три различных связывающих элемента, где связывающие элементы выполнены с возможностью связывания с различными клеточными маркерами, выбранными из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В другом варианте осуществления набор может содержать по меньшей мере четыре различных связывающих элемента, где связывающие элементы выполнены с возможностью связывания с различными клеточными маркерами, выбранными из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В другом варианте осуществления набор может содержать по меньшей мере пять различных связывающих элементов, где связывающие элементы выполнены с возможностью связывания с различными клеточными маркерами, выбранными из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

В другом варианте осуществления набор может содержать панель связывающих элементов, где панель связывающих элементов содержит связывающий элемент, специфичный для каждого из клеточных маркеров SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141.

Связывающие элементы набора могут включать антитела, как описано в настоящем документе. Связывающие элементы набора могут быть мечеными, как описано в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с SSEA1 содержит антитело HI98 или 480-1-1. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для

связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с GD2 может содержать антитело с теми же CDR, что и любое из антител 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN2 или PB22.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с GD3 содержит антитело DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с GD3 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с GD3 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с GD3 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело DMab-7 или VINIS56. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с GD3 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело DMab-7 или VINIS56.

В одном из вариантов осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с CD141 содержит антитело 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с CD141 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное конкурировать за связывание с антителом 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с CD141 может содержать такой связывающий элемент, как антитело, способное связываться с тем же эпитопом, что и антитело 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с CD141 может содержать антитело с той же цепью VL и VH, что и антитело 1A4. В другом варианте осуществления связывающий элемент набора для применения для идентификации/связывания с CD141 может содержать антитело с теми же CDR, что и антитело 1A4.

Набор может дополнительно содержать реагенты или связывающие элементы, подходящие для детекции метки.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, предлагается применение CD141 в качестве отрицательного клеточного маркера для идентификации предшественники не-слуховых клеток в смешанной популяции клеток.

Применение может включать определение наличия или отсутствия CD141 на клетке.

Дополнительный вариант осуществления представляет собой использование поверхностных клеточных маркеров предшественников слуховых клеток человека, как положительных, так и отрицательных, для исследования поведения стволовых клеток и предшественников слуховых клеток человека во время развития и после созревания.

Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет собой использование специфических клеточных маркеров предшественников слуховых клеток человека в качестве мишеней для фармакологического воздействия на предшественников слуховых клеток человека, *in vivo*, и *in vitro* после выделения или дифференцировки.

«Предшественник слуховых клеток», как применяют в настоящем документе, представляет собой клетку, которая является биологической клеткой, которая, как стволовая клетка, имеет тенденцию дифференцироваться в конкретные типы клеток, но является более специфической, чем стволовая клетка, и вынуждена

дифференцироваться в клетку, родственную слуховым, таким как клетки, подобные волосковым клеткам или слуховые нейроны. Различие между стволовыми клетками и клетками-предшественниками состоит в том, что стволовые клетки могут делиться до бесконечности, в то время как клетки-предшественники могут делиться только ограниченное число раз. Современные способы идентификации могут включать серии факторов транскрипции, которые используют в качестве молекулярных маркеров, такие как PAX2, PAX8, FOXG1, SOX2, если назвать несколько. Предшественники слуховых клеток встречаются *in vivo*, во время развития плода, в слуховой плакоде, отоцисте и в просенсорной области будущего сенсорного эпителия. Их присутствие во взрослом, зрелом ухе все еще обсуждается. Некоторые поддерживающие клетки, однако, могут иметь функции, подобные функциям предшественников. Как применяют в настоящем документе, заявка описывает аспекты, связанные с предшественниками слуховых клеток человека. Однако, все аспекты, описываемые в настоящем документе в связи с предшественниками слуховых клеток человека можно также понимать, как относящиеся к млекопитающим в более общем смысле.

Термин «положительный поверхностный клеточный маркер», применяемый в настоящем документе, означает маркер, такой как молекула, который находится на поверхности предшественников слуховых клеток и который можно использовать, возможно, с другими маркерами, для положительного подтверждения идентичности предшественников слуховых клеток. Ссылка на «положительный поверхностный клеточный маркер» или «положительный клеточный маркер» в настоящем документе предназначена для обозначения одного из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, или GD2.

Термин «отрицательный поверхностный клеточный маркер», применяемый в настоящем документе, означает маркер, такой как молекула, который находится на поверхности клетки и который не обнаруживается на предшественниках слуховых клеток. Таким образом, клетки, имеющие такой отрицательный маркер, могут быть подтверждены как предшественники не-слуховых клеток. Ссылка на «отрицательный поверхностный клеточный маркер» или «отрицательный клеточный маркер» в настоящем документе предназначена для обозначения CD141.

Термин «обогащать» или «обогащенный», применяемый в настоящем документе, предназначен для обозначения того, что доля предшественников слуховых клеток повышена в популяции клеток относительно предшественников не-слуховых клеток. Иным образом обогащение можно рассматривать как сортировку предшественников слуховых клеток от предшественников не-слуховых клеток. При обогащении предшественники слуховых клеток можно выделять из предшественников не-слуховых клеток или наоборот.

Изобретение не исключает использования описанных здесь клеточных маркеров в сочетании с другими известными или идентифицированными в будущем клеточными маркерами.

«Специфический» или «специфическое связывание», в основном, используют по отношению к ситуации, в которой один участник пары специфического связывания не демонстрирует никакого значимого связывания с молекулами, иными чем его партнер (-ы) по специфическому связыванию, и, например, имеет менее чем приблизительно 30% перекрестной реактивности с любой другой молекулой. В других вариантах осуществления он имеет менее чем 20%, 10%, или 1% перекрестной реактивности с любой другой молекулой. В этом контексте, связывающий элемент, который «выполнен с возможностью связывания» с конкретным клеточным маркером, представляет собой связывающий элемент, который способен к специфическому связыванию с клеточным

маркером, т.е. выполнен с возможностью связывания с указанным маркером без значимого связывания с другими молекулами. Где позволяет контекст, термины «выполнен с возможностью связывания» и «специфически связывается» можно использовать взаимозаменяемо.

5 Специалист поймет, что необязательные признаки одного из вариантов осуществления или аспектов изобретения могут быть применимы, при необходимости, к другим вариантам осуществления или аспектам изобретения.

После общего описания изобретения предлагаются для иллюстрации следующие примеры, которые не ограничивают заявленное изобретение.

10 **Примеры**

Работа, которая привела к этому изобретению, получила финансирование из Седьмой рамочной программы Евросоюза FP7/HEALTH-2013-INNOVATION-1 с номером соглашения о субсидировании 603029.

Очистка предшественников слуховых клеток из гетерогенных клеточных популяций

15 **Введение**

Необходимость в потенциальной очистке предшественников слуховых клеток

Протоколы, оптимизированные для управления ЧЭСК, дают (в лучшем случае) популяции клеток с высокой представленностью желаемого типа клеток из-за ряда ключевых ограничений нашей способности контролировать стволовые клетки. На 20 эффективность дифференцировки могут влиять такие проблемы, как разнородные исходные культуры, изменения факторов роста, среды и остальных расходных материалов от партии к партии, изменчивость клеточной линии и плотность посева клеток. Был разработан ряд протоколов для получения предшественников слуховых клеток из ЧЭСК [1,2], но все они дают начало смешанным культурам только с 25 небольшим подтипом предшественников. В настоящее время эксперименты по дифференцировке слуховых клеток очищаются вручную для выделения предшественников, что включает удаление ненужных типов клеток на основании морфологии и/или экспрессии репортерных генов. Несмотря на то, что такой подход был эффективен для облегчения последующей дифференцировки нейронов/волосковых 30 клеток, он является трудоемким и имеет тенденцию к переносу типов клеток, не являющихся предшественниками. Таким образом, для того чтобы терапия стволовыми клетками развивалась по направлению к клиническому применению, необходим более точный объективный способ, который можно масштабировать до большого числа клеток.

35 Активируемая флуоресценцией сортировка клеток (FACS) представляет собой широко используемый способ для разделения подгрупп клеток внутри популяции на основании дифференциальной экспрессии поверхностных клеточных маркеров. Способ требует идентификации уникальных профилей экспрессии белков клеточной поверхности в клетках, которые предполагается отсортировать от гетерогенной популяции, в сочетании 40 с доступностью подходящих антител для таких белков. Мы провели скрининг известных антител на присоединение к антигенам клеточной поверхности в культурах ЧЭСК, которые подвергались дифференцировке в слуховые клетки, для идентификации кандидатов для применения в FACS для очистки предшественников слуховых клеток.

Были разработаны протоколы для направления ЧЭСК по линиям дифференцировки 45 слуховых клеток к фенотипам сенсорных нейронов и волосковых клеток через промежуточное состояние, обозначаемое как «предшественники слуховых клеток». Протоколы, использованные для получения предшественников слуховых клеток, включали индуцирование FGF при помощи FGF3 и FGF10 (фигура 1a и Chen et al., 2012),

и более современный способ, который включал воздействие на передачу сигнала WNT, с добавлением этапа WNT-ингибирования (с использованием IWR-1-эндо) с последующим индуцированием WNT (при помощи BIO) (фигура 1b).

Был предпринят скрининг антител на гетерогенных популяциях клеток, полученных из вышеупомянутых протоколов, с целью найти подходящие поверхностные клеточные маркеры, которые можно использовать для очистки популяций предшественников слуховых клеток при помощи FACS.

Способы и результаты

ЧЭСК из культур Shef3.2, репортерной H14-NOP-SOX2 и H14s9 подвергали дифференцировке в 96-луночных планшетах при помощи или «протокола FGF» (фигура 1a) или «протокола WNT» (фигура 1b). Проводили прижизненное окрашивание полученных культур панелями антител к клеточной поверхности перед фиксированием и визуализацией в IN Cell Analyser 2200. Было три этапа скрининга.

1. Пилотный скрининг с использованием антител CSCB. H14-Использовали репортерную линию NOP-SOX2 и протокол WNT.

2. Основной скрининг с использованием панели для скрининга поверхностных клеточных маркеров человека BD lyoplate с 242 антителами. Использовали линию H14s9 и протокол WNT (3 планшета с повторами).

3. Основной скрининг с использованием панели для скрининга поверхностных клеточных маркеров человека BD lyoplate с 242 антителами. Использовали линию Shef3.2 и протокол FGF (2 планшета с повторами).

После визуализации данные обрабатывали при помощи программного обеспечения Developer Toolbox и дополнительно анализировали при помощи Excel и SPSS.

Три эксперимента обобщены в таблице 1.

Таблица 1. «Пилотный» делали с использованием панели антител CSCB, «BD скрининг» делали с использованием панели для скрининга поверхностных клеточных маркеров человека BD Lyoplate

	Пилотный	BD Скрининг 1	BD скрининг 2
Линия	H14-NOP-SOX2	H14s9	Shef3.2
Планшетов с повторами	2	3	2

1.1 Пилотный скрининг с использованием панели антител CSCB-Sheffield

На начальной фазе скрининга использовали относительно небольшую панель антител, доступную в Центре биологии стволовых клеток (CSCB) в Шеффилде (Таблица 2).

Таблица 2. Панель антител Центра биологии стволовых клеток, использованная для начального скрининга

Панель антител CSCB	
	P3X AG отрицательный контроль)
	TRA-1-85 положительный контроль)
	480-1-1 (также известный как SSEA1, CD15)
	813-70 (также известный как SSEA4)
	TRA-1-60s
	TRA-1-81
	TRA-2-49/6E
	ME20/4 (также известный как P75)
	B159
	TRA-2-10
	VINIS 53
	ME311
	HNK-1
	VIN2PB22 (также известный как GD2)
	VINIS56 (также известный как GD3)
	A2B5

Репортерную линию ЧЭСК, которая экспрессирует EGFP, под воздействием энхансера

SOX2, специфического для назальной и слуховой плакод, подвергали дифференцировке с использованием протокола «WNT» (фигура 1b). Прижизненное окрашивание проводили при помощи панели антител в конце индуцирования (~12 суток), и клетки затем фиксировали, прежде чем все они были помечены Hoechst, и визуализировали с использованием автоматической системы микроскопии (IN Cell Analyser 2200, GE Healthcare). При помощи программного обеспечения Developer были идентифицированы отдельные клетки на основании экспрессии Hoechst, затем записывали интенсивность флуоресценции GFP (репортер SOX2 внутри клеток) и Alexa 568 (флуорохром, присоединенный к вторичному антителу, которое использовали против антител к поверхностным клеточным маркерам) и использовали для определения положительной экспрессии в каждой клетке. Положительность определяли как интенсивность флуоресценции выше, чем наблюдаемая для нереагирующего IgG, лунки с отрицательным контролем (IgG, вырабатываемые родительской линией миеломы P3X63Ag8).

В этом первичном скрининге использовали два 96-луночных планшета, которые незначительно различались только по способу окрашивания: планшет 1 окрашивали в соответствии с протоколом биовизуализации BD Lyoplate с использованием 5% FBS в DMEM в качестве среды для выращивания с добавленными к ней антителами и планшет 2 окрашивали, как и планшет 1, но с 5% FBS в PBS (с CaCl₂ и MgCl₂) вместо среды для выращивания.

Ряд потенциальных попаданий был выявлен в панели антител CSCB. На фигуре 2 представлены данные из этого эксперимента, показывающие каждое антитело в отдельной вставке, с осью x с интенсивностью флуоресценции репортера SOX2 (GFP) и осью y с интенсивностью флуоресценции поверхностного клеточного маркера. Вставки расположены сверху вниз в зависимости от доли клеток, положительных по поверхностному клеточному маркеру, причем верхний левый угол содержит наиболее положительные, а нижний правый - наименее положительные. TRA-1-85 представляло собой антитело для положительного контроля, P3X представляло собой антитело для отрицательного контроля. Лучшие попадания находятся в первом столбце, и самые наихудшие кандидаты - в последнем.

Другой способ анализа на основании процентного содержания клеток, положительных по каждой лунке, и числа повторных лунок на антитело, которые оценивали как положительные при порогах >25% или >10%, подтвердил три лучших попадания как SSEA1, GD3 и TRA-2-49, с SSEA4 (813-70) непосредственно после них.

Не было особого различия между инкубациями антител в PBS или в DMEM, поэтому для будущих экспериментов был выбран DMEM, поскольку он образует компонент среды для дифференцировки, в которой растут клетки во время индуцирования в направлении слуховых клеток. Было обнаружено, что прижизненное окрашивание не оказывает вредного влияния на клетки каким-либо очевидным образом (т.е. не происходит дополнительного открепления клеток во время протокола), и рекомендуется для способов с BD Lyoplate поскольку предварительная фиксация может привести к ложным результатам. Прижизненное окрашивание также было бы более подходящим для будущих применений, когда необходимы живые предшественники для дальнейших манипуляций.

1.2 Начальное подтверждение попаданий из панели CSCB

Антитела к SSEA-1 и GD3 были выбраны для подтверждения того, что они эффективно связываются с субпопуляцией предшественников слуховых клеток. Для того чтобы освободить канал GFP на микроскопе, мы вернулись к родительской линии ЧЭСК, из которой получали репортерную, H14s9. Клетки подвергали дифференцировке

тем же способом, что и при первичном скрининге, затем прижизненно окрашивали антителами к SSEA-1 и GD3 (в нескольких отдельных лунках, т.е. не смотрели совместную экспрессию поверхностных белков). Клетки затем фиксировали и пермеабелизировали таким образом, чтобы их можно было исследовать на ядерные (транскрипционные) маркеры слуховых клеток, PAX2, SOX2 и FOXG1. Снова использовали Hoechst для идентификации ядер отдельных клеток. Использовали такой же сбор данных и способы анализа, что и для первичного скрининга. Эти данные указывают на то, что популяция, положительная по SSEA1, представляет собой подтип клеток, положительных по каждому из трех факторов транскрипции (Таблица 3i).

Данные для GD3 были аналогичными, за исключением доли (3,4%) клеток, которые являются GD3-положительными, но не PAX2-положительными (Таблица 3ii). Эти данные в сочетании с морфологическими данными, показывающими окрашивание GD3 у некоторых клеток, не связанных с морфологией предшественников слуховых клеток, позволяют предположить, что GD3 является менее специфичным для желаемого подтипа клеток, чем SSEA1. См. фигура 3.

Таблица 3i. Процентное содержание клеток, положительных по маркерам предшественников слуховых клеток и SSEA1

Антитела	+/+	+/-	-/+	-/-
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

Таблица 3ii. Процентное содержание клеток, положительных по маркерам предшественников слуховых клеток и GD3

Антитела	+/+	+/-	-/+	-/-
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

2.1 Скрининг панелью антител BD Lyoplate

Работа с панелью антител CSCB подтвердила возможность использования автоматизированного способа биовизуализации для скрининга поверхностных клеточных маркеров и позволила провести тщательную оптимизацию системы перед проведением более полного скрининга на основании панели для скрининга поверхностных клеточных маркеров человека BD Lyoplate (BD Biosciences). Эта панель анализировала связывание 242 антител, и, как ожидалось, могла расширить число идентифицированных маркеров.

Скрининг BD Lyoplate позволял сделать 5 повторов в 96-луночных планшетах. Мы разделили эксперимент на две части. Три повтора сделали с использованием клеточной линии H14s9, дифференцированной при помощи протокола WNT, в то время как оставшиеся два повтора сделали с использованием клеточной линии Shef3.2 с протоколом FGF. Этот дизайн эксперимента, таким образом, включал 5 общих повторов, охватывающих две независимых клеточных линии и два различных протокола дифференцировки. Мы полагали, что это максимально увеличит шансы на получение самых лучших кандидатов для поверхностных маркеров предшественников слуховых клеток.

После обработки данных проводили анализ для идентификации общего числа клеток в лунке и числа клеток, которые являются положительными. Положительный порог рассчитывали на основе последовательного анализа планшетов через анализ лунки

A1, которую определяли как контроль (без первичного антитела) на каждом планшете. Затем рассчитывали процентное содержание положительных клеток для каждой лунки. Затем сопоставили эти данные для каждого из трех планшетов антител BD, т.е. пяти повторов для каждого планшета, 3 для H14s9 и 2 для Shef3.2.

Затем использовали два различных типа анализов, первый на основе интенсивности, объективный критерий, и последующий - на основе морфологии, субъективный критерий.

Объективный анализ пороговых значений мечения

1. Мы присваивали каждой лунке процент положительных значений и перечисляли все пять повторов рядом для сравнения.

2. Клетки, которые были <10% положительными, классифицировали как отрицательные, ≥10% классифицировали как положительные.

3. Если три или более повторов лунок были отрицательными, тогда лунку и соответствующее антитело классифицировали как не являющиеся кандидатами и удаляли из дальнейшего рассмотрения.

4. Если все четыре или пять лунок были >80% положительными, антитело считают недостаточно селективным (т.е. оно связывается слишком со многими типами клеток) и, таким образом, оно классифицируется как не кандидат и исключается из рассмотрения в будущем.

5. Мы проверили, что оставшиеся лунки имеют как минимум три положительных повтора, которые охватывают две клеточных линии, т.е., если повторы 1-3 являются положительными (повторы H14s9), а 4 и 5 отрицательными (повторы Shef3.2), тогда лунку следует исключить так как это предполагает, что антитело специфически связывается с одной линией (или возможно только с клетками, которые подверглись дифференцировке с протоколом WNT в отличие от протокола FGF).

На фигуре 4 представлены вырезанные части данных планшета 1, использованные для иллюстрации того, как были реализованы критерии, описанные выше. Представлены данные для лунок с F5 по G6 и процентные данные были отформатированы таким образом, что, чем выше процент, тем темнее затенение, чтобы было легче увидеть различия. Повторы 1-3 представляют собой повторы H14s9/протокол WNT. Повторы 4 и 5 представляют собой повторы Shef3.2/протокол FGF.

На фигуре 4a очерченные лунки попадают в три и более отрицательных повторов (пункт 3 выше) и, таким образом, удаляются как не являющиеся кандидатами. На фигуре 4b, очерченные лунки попадают в категорию недостаточно селективных (пункт 4 выше) и, таким образом, удаляются как не являющиеся кандидатами. На фигуре 4c, очерченные лунки попадают в категорию специфического связывания для линии/протокола (пункт 5 выше) и также удаляются как не являющиеся кандидатами.

Субъективный анализ на основе морфологии

После того как все лунки, не являющиеся кандидатами, были удалены, мы вернулись к данным визуализации и проверили оставшиеся лунки чтобы выяснить, действительно ли антитело связывается с популяцией, которую мы могли бы классифицировать как предшественников слуховых клеток только по морфологии. Этот анализ был сделан только для повторов Shef3.2, поскольку H14s9 были слишком конфлюэнтными для оценки морфологии глазами.

Вместе эти анализы подтверждают три лучших кандидата, выявленных в ходе первоначального пилотного скрининга (SSEA1, SSEA4 и GD2). GD3 и TRA2-49 (щелочная фосфатаза) не были представлены в BD Lyoplate. Хотя были выявлены некоторые положительные маркеры «второго уровня», они не прошли строгие критерии, установленные в этом первоначальном исследовании, и только эти пять (SSEA1, SSEA4,

GD2, GD3 и TRA2-49) отвечают всем критериям.

Способы для фигур 6 и 7

Плоды человека различного гестационного возраста фиксировали в течение два часов в 4% PFA в PBS при 4°C. Образцы затем подвергали крио протекции в серии
 5 увеличивающейся концентрации сахарозы 5%-30% в PBS и погружали в Cryo-M-Bed (Bright), перед заморозкой в жидком изопентане, охлажденном в жидком азоте. Делали серии срезов толщиной 10 мкм на криостате и наносили на слайды, покрытые желатином. В кратком изложении, срезы промывали PBS и инкубировали 15-30 минут в блокирующем буфере (5% нормальная ослиная сыворотка с 0,1% Тритоном в PBS) при
 10 комнатной температуре. Использовали следующие антитела: к CD141 (Biolegend) и к нейрофиламенту 200 (Sigma). Сигналы визуализировали при помощи вторичных антител, конъюгированных с Alexa. Контрастное окрашивание ядра проводили при помощи DAPI (Sigma).

Способы для фигур 8 и 9

ЧЭСК из линии Shes3.2 индуцировали для дифференцировки в предшественники слуховых клеток в течение 14 суток с использованием «протокола FGF», как описано в [1]. На этом этапе нефиксированные клетки метили антителами к SSEA4, TRA-2-49 и CD141 антитела, конъюгированными с флуорохромами Alexa 647, Alexa 488 или Brilliant Violet 421, соответственно (Biolegend). Клетки разделяли и анализировали при помощи
 20 BD FACSJazz.

Для фигуры 9, сортированным и несортированным клеткам позволяли дифференцироваться дополнительно в течение 17, 20 и 26 суток в клетки, подобные волосковым клеткам, с использованием органоидной (3D) системы культивирования, разработанной в нашей лаборатории. Дифференцировку в клетки, подобные волосковым
 25 клеткам, можно было также проводить при помощи опубликованного способа (например, [2]). Выделяли РНК и анализировали экспрессию гена путем количественной ПЦР с использованием способа DD-Ct.

Эти результаты позволяют предположить, что популяция, дважды положительная по SSEA4+/TRA2-49+, содержит клетки-предшественники, способные к дифференцировке
 30 в линию волосковых клеток, даже при отделении от фракции, которая не является дважды положительной по SSEA4/TRA2-49 (одинарные положительные или -/- клетки). Несортированная популяция была все еще способна дифференцироваться, с учетом того, что она содержит относительно большой процент клеток SSEA4+/TRA2-49+ ($54,8 \pm 5,6\%$, среднее $\pm$ s.e.m.).

Источники информации

- [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.
- 40 [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.

(57) Формула изобретения

- 45 1. Способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток, включающий определение того, содержит ли клетка по меньшей мере два поверхностных клеточных маркера, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141, в котором клеточные маркеры SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 и

GD2 являются положительными клеточными маркерами, и в котором клеточный маркер CD141 является отрицательным клеточным маркером.

2. Способ по п. 1, в котором по меньшей мере два положительных клеточных маркера применяют в комбинации для идентификации предшественников слуховых клеток человека.

3. Способ по п. 1, в котором по меньшей мере три, четыре или пять положительных клеточных маркеров применяют в комбинации для идентификации предшественников слуховых клеток человека.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором положительный клеточный маркер или по меньшей мере два положительных клеточных маркера применяют в комбинации с отрицательным клеточным маркером CD141.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором смешанную популяцию клеток получают из протокола или во время протокола дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, необязательно, где

плюрипотентными стволовыми клетками являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); или

где смешанную популяцию клеток получают из способов или во время способов дедифференцировки, транс-дифференцировки или прямого перепрограммирования в человеческие клеточные линии слуховых клеток; или

где смешанную популяцию клеток получают из ткани, необязательно, где клетки представляют собой образцы преддверия и улитки, полученные при хирургических вмешательствах из внутреннего уха взрослых людей.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором идентификация предшественников слуховых клеток человека происходит *in vivo*.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором смешанная популяция клеток контактирует с одним или несколькими связывающими элементами, выполненными с возможностью связывания с клеточными маркерами.

8. Способ по п. 7, в котором связывающий элемент содержит антитело, фрагмент антитела, или его миметик.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, включающий этап детекции, где клеточные маркеры детектируются как присутствующие или отсутствующие на клетке или группе клеток.

10. Способ по любому из пп. 7-9, где связывающий элемент содержит метку для идентификации.

11. Способ по п. 10, в котором метка содержит флуорофор.

12. Способ по любому из пп. 9-11, в котором детекция включает использование FACS и/или использование MACS.

13. Способ идентификации предшественников слуховых клеток человека в смешанной популяции клеток с использованием по меньшей мере двух поверхностных клеточных маркеров, выбранных из SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141, включающий:

- обеспечение связывающих элементов, специфичных по меньшей мере для двух различных клеточных маркеров;

- контакт смешанной популяции клеток со связывающими элементами; и

- выявление связывания или отсутствия связывания связывающих элементов с клетками в смешанной популяции клеток;

где клеточные маркеры SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 и CD141 являются положительными клеточными маркерами, и где клеточный маркер CD141 является отрицательным клеточным маркером.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что дополнительно включает определение того, что клетка является предшественником слуховых клеток человека, если:

а) связывающие элементы, выполненные с возможностью связывания с положительными клеточными маркерами, связываются по меньшей мере с двумя различными положительными клеточными маркерами на клетке; или

б) связывающий элемент, выполненный с возможностью связывания с одним из положительных клеточных маркеров, связывается по меньшей мере с одним из положительных клеточных маркеров на клетке, и связывающий маркер, выполненный с возможностью связывания с отрицательным клеточным маркером CD141, не связывается с клеткой.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что дополнительно включает определение того, что клетка является предшественником слуховых клеток человека, если:

а) связывающие элементы, выполненные с возможностью связывания с положительными клеточными маркерами, связываются по меньшей мере с тремя различными положительными клеточными маркерами на клетке; или

б) связывающие элементы, выполненные с возможностью связывания по меньшей мере с двумя различными положительными клеточными маркерами, связываются по меньшей мере с двумя различными положительными клеточными маркерами на клетке, и связывающий маркер, выполненный с возможностью связывания с отрицательным клеточным маркером CD141, не связывается с клеткой.

16. Способ обогащения предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток, включающий:

- идентификацию предшественников слуховых клеток человека в соответствии со способом по любому из пп. 1-15; и

- сортировку клеток таким образом, что предшественники слуховых клеток человека отделены от предшественников не-слуховых клеток, и, таким образом, обогащение популяции предшественниками слуховых клеток человека.

17. Способ по п. 16, в котором сортировка включает FACS и/или включает MACS.

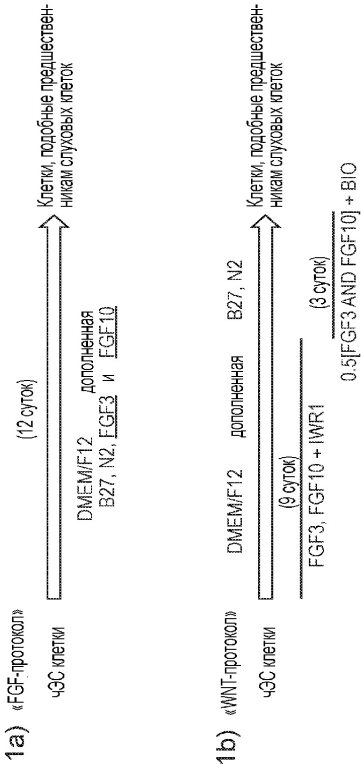
18. Способ получения популяции предшественников слуховых клеток человека, включающий:

- дифференцировку предшественников не-слуховых клеток в предшественники слуховых клеток человека, при этом некоторые предшественники не-слуховых клеток остаются в популяции, формируя смешанную популяцию клеток; и

- обогащение предшественников слуховых клеток человека из смешанной популяции клеток в соответствии со способом по п. 16 или 17.

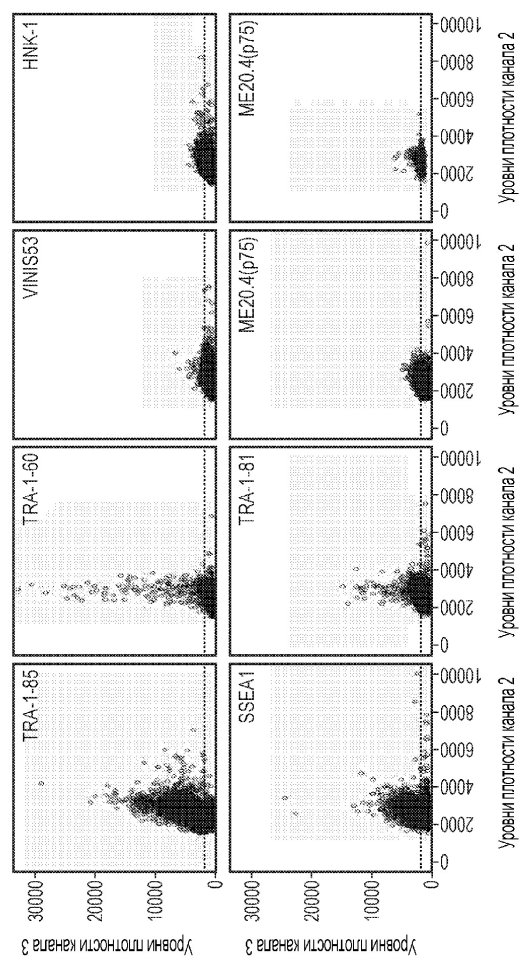
1

1/11

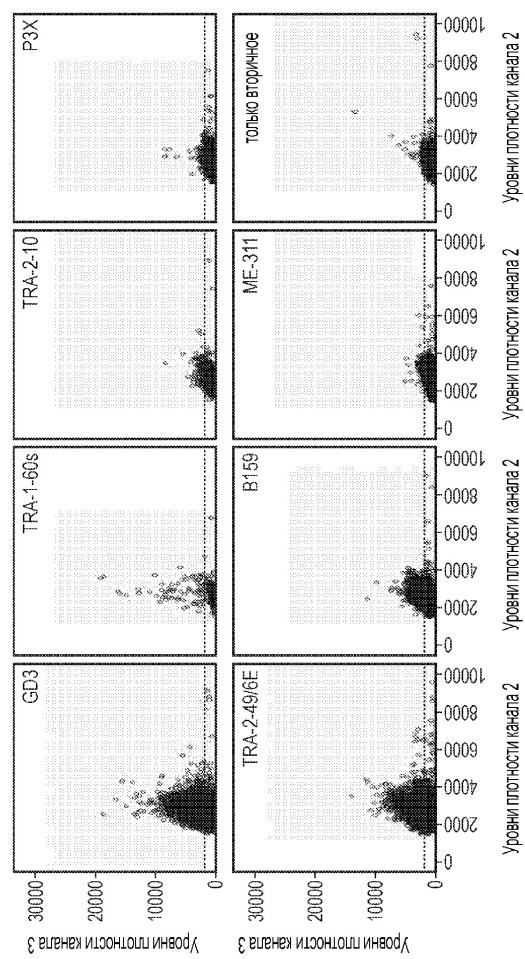


ФИГ. 1

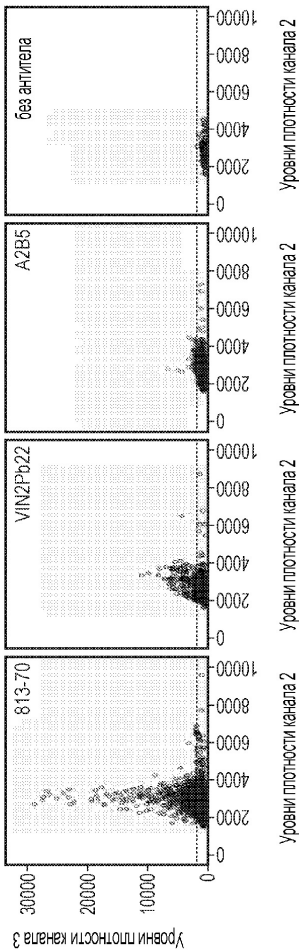
2



ФИГ. 2

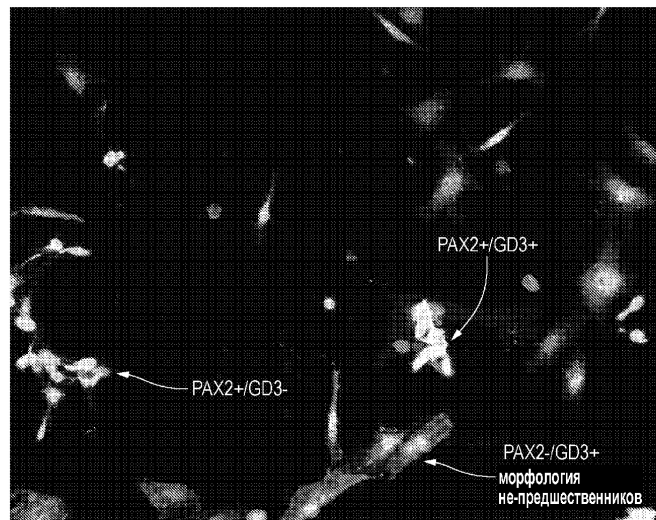


ФИГ. 2
(продолжение)



ФИГ. 2
(продолжение)

5/11



ФИГ. 3

		% положительных						
Лунка		1	2	3	4	5		
F - 5		3.2	3.7	0.1	2.0	4.0		Слишком низкий
F - 6		2.7	2.3	1.3	6.9	5.0		
F - 7		2.0	5.4	1.1	18.6	12.4		
F - 8		15.8	48.8	2.3	38.0	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	80.0	88.9	96.5		
F - 12		69.6	88.0	31.6	46.8	47.0		
G - 1		99.9	99.8	90.5	89.2	80.9		Слишком низкий
G - 2		5.0	14.9	0.5	16.0	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		

Shef3.2/FGF протокол

H14s9/WNT протокол

ФИГ. 4a

% положительных					
Пункт	1	2	3	4	5
F - 5	3.2	3.7	0.1	2.0	4.0
F - 6	2.7	2.3	1.3	6.9	5.0
F - 7	2.0	5.4	1.1	18.6	12.4
F - 8	15.8	48.8	2.3	38.0	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	80.0	88.9	96.5
F - 12	69.6	88.0	31.6	46.8	47.0
G - 1	99.9	99.8	90.5	89.2	80.9
G - 2	5.0	14.9	0.5	16.0	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
H14s9/WNT протокол					
Shef3.2/FGF протокол					

Слишком высокий

Слишком высокий

ФИГ. 4b

% положительных					
Пункт	1	2	3	4	5
F - 2	78.5	63.5	83.7	52.3	36.9
F - 3	73.0	98.0	97.9	8.2	6.7
F - 4	93.5	69.0	77.7	22.3	23.4
H14s9/WNT протокол					
Shet3.2/FGF протокол					

Результат, специфический для линии протокола

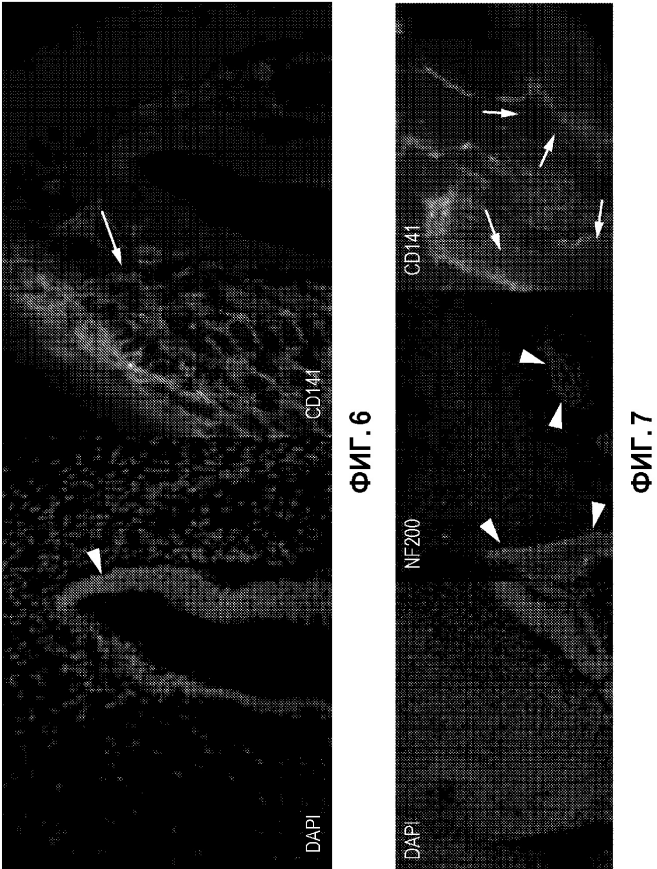
ФИГ. 4с

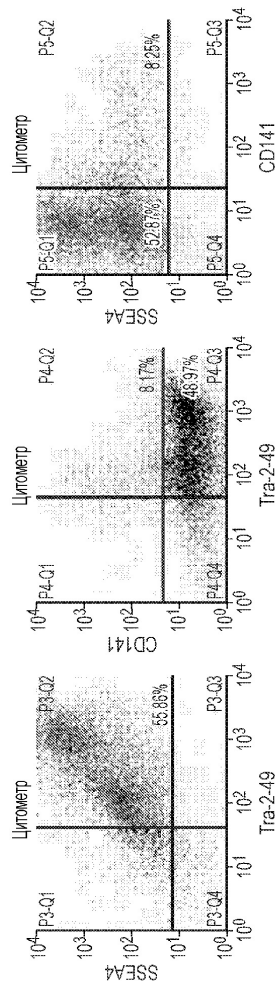
% положительных					
Пункт	1	2	3	4	5
B - 9	74.8	82.4	53.6	66.5	2.8
C - 8	99.8	95.8	97.4	4.3	21.6
C - 11	95.7	85.3	89.7	34.8	29.1
C - 12	71.3	53.5	75.0	80.1	11.0
H14s9/WNT протокол					
Shet3.2/FGF протокол					

CD15
GD2
SSEA1
SSEA4

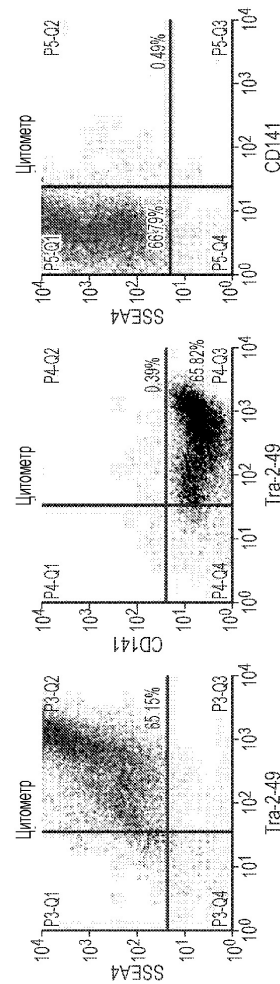
ФИГ. 5

9/11





ФИГ. 8a



ФИГ. 8b

