

IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DEL PROGENITOR ÓTICO HUMANO

La presente invención se refiere en general 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 usarse en la identificación y/o aislamiento.

La sordera es una condición con una alta prevalencia en todo el mundo, producida principalmente por la pérdida de las células capilares sensoriales y sus neuronas asociadas de ganglio espiral (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 preservación relativa de las células capilares, es responsable de una proporción sustancial de pacientes con discapacidad auditiva. Aunque la pérdida de células capilares puede ser evitada parcialmente por un implante coclear, no se dispone de un tratamiento de rutina para la pérdida de neuronas sensoriales, ya que la inervación deficiente limita el rendimiento potencial de un implante. El uso de células madre para recuperar el circuito sensorial dañado es una estrategia terapéutica potencial.

Se han desarrollado protocolos para inducir la diferenciación de las células madre embrionarias humanas (hESC) utilizando señales, como FGF3 y FGF10, involucradas en la especificación inicial del código de placa ótica (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). Los progenitores óticos inducidos son capaces de diferenciarse *in vitro* en células similares a células capilares y neuronas auditivas que muestran las propiedades electrofisiológicas esperadas. Además, cuando se trasplantan a un modelo de neuropatía auditiva, los neuroprogenitores óticos crean, diferencian y mejoran significativamente los umbrales de respuesta evocados auditivos. Sin embargo, el método de inducción FGF3/10 utilizado es ineficiente, produciendo aproximadamente el 20% de los tipos de células requeridos solamente.

Si los progenitores óticos derivados de células madre embrionarias humanas (hESC) se van a usar en un entorno clínico, es esencial que esas células se puedan aislar de otros tipos de células que se produzcan inadvertidamente durante el procedimiento 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, se deben identificar marcadores específicos de la superficie celular que se unen al tipo de célula clave, por ejemplo, progenitores óticos.

5 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).

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para identificar y potencialmente aislar progenitores óticos humanos de poblaciones mixtas de

10 células.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona

15 un método para identificar células progenitoras óticas humanas en una población mixta de células utilizando 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

20 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

25 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,

30 se identifican como células progenitoras óticas humanas.

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 utilizando al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1 (también conocido como CD15), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141, comprendiendo el método:

- proporcionar miembros de unión específicos para al menos dos marcadores celulares diferentes (es decir, los al menos dos marcadores celulares diferentes se seleccionan de SSEA1 (también conocido como CD15), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141);
- contactar 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.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para enriquecer células progenitoras óticas humanas a partir de una población mixta de células, comprendiendo el método:

- identificar las células progenitoras óticas humanas de acuerdo con la invención en el presente documento; y
- clasificar las células de modo 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.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una población de células progenitoras óticas humanas, el método comprende:

- diferenciar las células progenitoras no óticas en células progenitoras óticas humanas, por lo 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 la presente invención.

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 de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

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

Ventajosamente, los marcadores celulares SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141 se han identificado a través de múltiples rondas de selecciones utilizando un panel de anticuerpos de superficie celular en dos líneas de células madre embrionarias humanas diferentes, diferenciados en progenitores óticos usando dos diferentes métodos.

5 Usando umbrales de expresión objetivos y cuantitativos y análisis morfológico, cualitativo de la morfología progenitora ótica, se seleccionaron los siguientes marcadores que etiquetaron el tipo de célula correcto. Además, CD141 se identificó como un marcador negativo, es decir, marca las células que no son progenitores óticos. El proteoma de superficie celular de progenitores óticos pluripotentes humanos derivados de células madre

10 se ha caracterizado utilizando anticuerpos que pueden emplearse en citometría de flujo y clasificación celular automatizada fluorescente (FACS) para purificarlos de las poblaciones heterogéneas generadas a partir de la diferenciación de células madre pluripotentes. El aislamiento y la purificación pueden a) mejorar la aplicación directa para la terapia celular, definiendo mejor el tipo de célula apropiado y eliminando las células potencialmente

15 peligrosas y b) mejorar los ensayos *in vitro* para la detección y toxicidad de los medicamentos eliminando las células que podrían tener un efecto de confusión. Además, estos marcadores deberían ser muy útiles para purificar progenitores óticos para: 1) Hacer que se diferencien aún más en células capilares sensoriales o neuronas. Esto debería hacer que los protocolos de diferenciación sean más eficientes, facilitando la ampliación de escala

20 de las preparaciones para la detección de medicamentos de alto rendimiento; y 2) Seleccionar el tipo de célula adecuado para la terapia de trasplante celular, minimizando la contaminación con tipos de células no deseados y reduciendo los riesgos potenciales de la terapia de desarrollar efectos secundarios.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 - Inducción de células hES hacia un destino progenitor ótico se logra a través de la inducción de la señalización de FGF con FGF3 y FGF10. Se ha logrado un mejor rendimiento de los progenitores mediante la adición de la inactivación de WNT

30 durante los primeros 9 días, seguido de la activación de WNT durante 3 días con una reducción simultánea de la concentración de FGF3 y FGF10.

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 x y Alexa 568 del direccionamiento secundario de los anticuerpos marcadores de superficie celular en el eje y.

Figura 3 - Imágenes de GD3 (rojo), PAX2 (verde) y Hoechst (azul) combinadas. Las flechas indican: la colonia PAX2 +/GD3- de la morfología del progenitor neuronal ótico, la colonia PAX2+/GD3+ de los progenitores epiteliales óticos y células PAX2-/GD3+ no predichas de que sean progenitores óticos basados en la morfología.

Figura 4a - Los pozos resaltados no se considerarán como posibles aciertos, es decir, por debajo del umbral.

Figura 4b - Los pozos resaltados no se considerarán como posibles aciertos, es decir, por encima del umbral.

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

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

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

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

Figuras 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 colocalizan a 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 CD141 positivas que

van desde ~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. Las células doble positivo luego se dejaron diferenciar durante 17, 20 y 26 días en células similares a células capilares, utilizando un sistema de cultivo de organoide (3D) desarrollado en nuestro laboratorio. La diferenciación en células similares a células capilares también podría lograrse utilizando un método publicado (por ejemplo, Koehler et al, 2017). Las células no clasificadas también se diferenciaron junto con la comparación, y las muestras se analizaron mediante qPCR. Los marcadores celulares capilares Myo7a y Atoh1 fueron regulados en exceso en la población clasificada, después de 26 días de cultivo 3D. LGR5, un marcador celular madre y células de soporte se reguló en exceso en los progenitores inmaduros antes de la clasificación, y durante las primeras etapas de diferenciación, principalmente en las muestras de células sin clasificar. JAG1, un marcador celular de soporte, no fue regulado en exceso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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 utilizando 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.

5 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.

El uso de marcadores de superficie celular como se describe en el presente
10 documento puede comprender su uso en un paso de identificación/determinación. En particular, la determinación de si el marcador de superficie celular está presente o no en una célula, o está presente o no en un grupo de células. Los marcadores celulares positivos 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
15 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.

20 Los marcadores celulares positivos también se pueden usar en combinación con el marcador celular negativo CD141. En una modalidad, al menos un (es decir, uno de los) marcador celular positivo 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-
25 49, SSEA4 y GD2 se usan en combinación con el marcador celular negativo CD141. En otra modalidad, al menos tres (es decir, tres 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, al menos cuatro (es decir, cuatro de los) marcadores celulares positivos seleccionados de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 y GD2
30 se utilizan en combinación con el marcador celular negativo para 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, los al menos dos marcadores celulares que comprenden SSEA1 y GD3. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden SSEA1 y GD3, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden SSEA1 y TRA-2-49. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden SSEA1 y TRA-2-49, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden SSEA1 y SSEA4. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden SSEA1 y SSEA4, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden SSEA1 y GD2. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden SSEA1 y GD2, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden GD3 y TRA-2-49. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden GD3 y TRA-2-49, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden GD3 y SSEA4. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden GD3 y SSEA4, y el marcador celular negativo CD141. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden GD3 y GD2. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos marcadores celulares positivos que comprenden GD3 y GD2, y el marcador celular negativo CD141.

El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares, los al menos dos marcadores celulares que comprenden TRA-2-49 y SSEA4. El método puede comprender el uso de al menos dos marcadores celulares positivos, los al menos dos

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

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

La población mixta de células puede referirse de otra manera como una población celular heterogénea. La población mixta de células puede ser *in vitro*. El método de la invención puede ser *in vitro*. En una modalidad, la población mixta de células puede proporcionarse desde, o durante, un protocolo de diferenciación de células madre *in vitro* (como hESC o cualquier otra célula madre pluripotente como iPSC). En otra modalidad, la población mixta de células puede proporcionarse a partir de, o durante, los procedimientos de des-diferenciación, trans-diferenciación o reprogramación directa en linajes de células óticas humanas.

En otra modalidad, la población mixta de células puede proporcionarse a partir de tejido, por ejemplo a partir 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 del oído interno fetal en desarrollo y muestras cocleares y vestibulares obtenidas de intervenciones quirúrgicas de oídos internos adultos.

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

Una modalidad adicional, el método puede usarse para la identificación de células progenitoras óticas humanas *in vivo*, por ejemplo, post-operatoriamente durante o después de un tratamiento de trasplante de células.

El método de identificación puede comprender el direccionamiento de los marcadores celulares con un miembro de unión que es capaz de detección, 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
5 (alternativamente dispuestos para unirse) a los marcadores celulares.

El miembro de unión puede unirse preferentemente a un marcador celular descrito en el presente documento o ser específico de otra forma para un marcador celular descrito en el presente documento. El miembro de unión puede comprender un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o un mimético del mismo.

10 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
15 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
20 HI98 o 480-1-1.

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
25 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
30 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 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 las mismas 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, tal 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.

Los marcadores celulares y los anticuerpos dispuestos para unirse a los marcadores celulares pueden describirse e identificarse más detalladamente en las siguientes publicaciones, que se incorporan aquí como referencia.

15

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.)

20

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) 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.)

25

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) y (Stuhlmiller GM1,

30

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.)

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, 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 parcial o totalmente producido sintéticamente. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión a anticuerpo. Estos pueden derivarse de fuentes naturales, o pueden producirse parcial 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 diacuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Un anticuerpo monoclonal se puede referir como un "mAb".

Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, 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 lo tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales, miméticos y homólogos de anticuerpos, anticuerpos humanizados, incluido cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. Un mimético de anticuerpos puede comprender un aficuerpo.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de los antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados; y (vii) moléculas Fv de cadena única (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 a antígeno.

El método de la invención puede comprender un paso 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 entenderá que existen varios métodos para detectar la unión de miembros de unión, tales como anticuerpos, a un marcador de superficie celular. Dicho método puede comprender marcar el miembro de unión con una etiqueta/rótulo detectable o usar un miembro de unión secundario, como un anticuerpo, que está etiquetado o marcado 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 marcado de otro modo) para identificación. Una vez que un miembro de unión etiquetado se une al marcador celular, la célula puede denominarse "célula etiquetada". Se puede usar una etiqueta diferente para marcar cada especie de miembro de unión dispuesto para unirse a un marcador celular. La etiqueta puede comprender cualquiera de una etiqueta radioetiquetada, una etiqueta enzimática, una etiqueta magnética, una etiqueta de afinidad (como biotina o avidina), o una etiqueta detectable de emisión de luz, como fluoróforo o cromóforo; o combinaciones de los mismos. La etiqueta puede conjugarse con el miembro de unión, tal como mediante un 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 pueden proporcionarse como etiquetas pueden comprender cualquiera de los grupos seleccionados de derivados de xanteno, tales como fluoresceína, rodamina, verde de Oregón, eosina y rojo de Texas; derivados de cianina,

tales como cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina y merocianina; derivados de esquarina y esquarinas sustituidas con anillos, incluidos los tintes Seta, SeTau y Square; derivados de naftaleno (derivados de dansilo y prodan); derivados de cumarina; derivados de oxadiazol, tales como piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y benzoxadiazol; derivados del antraceno, como las antraquinonas, incluyendo DRAQ5, DRAQ7 y CyTRAK Orange; derivados de pireno, tales como azul en cascada; derivados de oxazina, tales 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, cristal violeta, verde de malaquita; y derivados de tetrapirrol, tales como porfina, ftalocianina y bilirrubina.

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

Un miembro de unión alternativo a los anticuerpos puede ser proporcionado por aptámeros, secuencias cortas de nucleótidos que pueden reconocer dominios de proteínas específicos. Debido a que los aptámeros son pequeños y cambian de conformación al unirse a su objetivo, pueden diseñarse para que el enlace específico libere un templador o genere un par de FRET que pueda detectarse.

La detección de células etiquetadas puede realizarse mediante cualquier ensayo adecuado, que puede comprender el uso de cualquiera de los grupos que comprenden inmunoensayos, espectrometría, western blot, ELISA, inmunoprecipitación, ensayo slot o dot blot, enfoque isoelectrico, SDS-PAGE y tinción inmunohistológica de microarreglo de anticuerpos, radio inmuno ensayo (RIA), fluoroinmunoensayo, un inmunoensayo utilizando un sistema de avidina-biotina o estreptoavidina-biotina, etc., o sus combinaciones. Estos métodos son bien conocidos 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, tal 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 por magnetismo). 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 utilizando al menos dos marcadores de superficie celular seleccionados de SSEA1 (también conocido como CD15), GD3, TRA-2-49 (fosfatasa alcalina), SSEA4, GD2 y CD141, comprendiendo el método:

- proporcionar 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);
- contactar 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 a al menos 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 a al menos 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 a al menos tres marcadores celulares positivos diferentes en la célula; o
- b) los miembros de unión dispuestos para unirse a al menos dos marcadores celulares positivos diferentes se unen a los al menos 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.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para enriquecer células progenitoras óticas humanas a partir de una población mixta de células, comprendiendo el método:

- identificar las células progenitoras óticas humanas de acuerdo con la invención en

el presente documento; y

- clasificar las células de modo 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.

5 En una modalidad, el aislamiento de las células progenitoras óticas humanas puede ser completo (es decir, 100% de aislamiento de 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
10 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
15 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
20 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
25 que haya menos del 0.01% de células progenitoras no óticas en la población.

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

30 Las células progenitoras no óticas se pueden desechar, destruir, secuestrar o contener de otro modo por separado de las células progenitoras óticas humanas.

En una modalidad, el procedimiento de enriquecimiento mantiene la

viabilidad de las células progenitoras óticas humanas.

En una modalidad, la clasificación es por FACS. En otra modalidad, el enriquecimiento y la 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 la clasificación de células progenitoras óticas humanas se realiza mediante el uso de MACS.

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

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una población de células progenitoras óticas humanas, el método comprende:

- diferenciar, des-diferenciar, diferenciar-trans o reprogramar de forma dirigida una población de células progenitoras no óticas en células progenitoras óticas humanas, por lo 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 la presente invención.

La diferenciación de una población de células progenitoras no óticas puede comprender la diferenciación de una población de células madre, como las hESC o iPSC. Por ejemplo, las células progenitoras no óticas pueden comprender células madre, como hESC o iPSC. La des-diferenciación de una población de células progenitoras no óticas puede comprender la des-diferenciación de una población de células más maduras. Por ejemplo, las células progenitoras no óticas pueden comprender células maduras (totalmente diferenciadas). La diferenciación trans o la reprogramación dirigida de una población de células progenitoras no óticas puede comprender la diferenciación trans o la reprogramación dirigida de una población de células de un linaje diferente (es decir, un linaje no ótico).

Un experto en la técnica conoce muchos agentes de diferenciación que pueden diferenciar células madre en tipos específicos de células, tales como células progenitoras óticas. Por lo tanto, se prevé que las células madre puedan diferenciarse en

células progenitoras óticas por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos de agentes de diferenciación incluyen, entre otros, ligandos de FGF, inhibición y activación de WNT, IGF1, inhibición y activación de TGF, suero de ternera fetal, factor de crecimiento nervioso, eliminación de EGF, eliminación de bFGF (o ambos), BDNF, hormona tiroidea, BMP, LIF, sonic hedgehog, GDNF, VEGF, interleucinas, interferonas, SCF, activinas, inhibinas, quimiocinas, ácido retinoico y CNTF.

La diferenciación puede estar de acuerdo con, pero no limitado a, el protocolo descrito por 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), o Ronaghi *et al.* (2014. *Stem Cells Dev*, 23(11), 1275-1284), que se incorporan aquí como referencia. Por ejemplo, la diferenciación puede comprender la inducción de células progenitoras óticas a partir de células madre embrionarias humanas (hESC) utilizando señales involucradas en la especificación inicial del código de placa ótica. En particular, la diferenciación puede comprender la inducción de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) con FGF3 y FGF10, opcionalmente en donde la concentración de FGF3 y FGF10 es de aproximadamente 50 ng/ml. La diferenciación puede comprender los pasos descritos en la figura 1a de este documento o Chen *et al.* 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 la inducción de WNT (consulte la figura 1b en este documento). La diferenciación puede comprender los pasos descritos en la figura 1b del presente documento.

Se prevé que las células progenitoras no óticas pueden ser células madre de cualquier fuente conocida, tejido embrionario (fetal) o tejido post-embrionario. En una modalidad, las células progenitoras no óticas para la diferenciación comprenden o consisten en células madre pluripotentes, tales como células madre embrionarias humanas (hESC) o 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 mesenquimal, tejido adiposo u otros tejidos.

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 de

SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

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.

5 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 entre 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 de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 y CD141.

10 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.

Los miembros de unión del kit pueden comprender anticuerpos como se describe en el presente documento. Los miembros de unión del kit pueden etiquetarse como se describe en el presente documento.

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 usarse 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 usarse 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 usarse 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 usarse para identificar/unirse a SSEA1 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo HI98 o 480-1-1.

En una modalidad, el miembro de unión del kit para usarse para identificar/unirse a SSEA4 comprende el anticuerpo MC-813-70. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usarse 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 usarse 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 usarse 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 usarse 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 del kit para usarse para identificar/unirse a TRA-2-49 comprende el anticuerpo TRA-2-49/6E. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usarse 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 usarse 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 usarse 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 usarse 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 del kit para usarse para identificar/unirse a GD2 comprende cualquiera de los anticuerpos 14.18, DMab-20, 14G2a, VIN 2 o PB22. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usarse 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 del kit para usarse 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 del kit para usarse 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 usarse 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.

En una modalidad, el miembro de unión del kit para usarse para identificar/unirse a GD3 comprende el anticuerpo DMab-7 o VINIS56. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usarse 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 usarse 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 usarse 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 usarse 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 del kit para usarse para identificar/unirse a CD141 comprende el anticuerpo 1A4. En otra modalidad, el miembro de unión del kit para usarse 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 usarse 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 usarse 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 usarse para identificar/unirse a CD141 puede comprender un anticuerpo que tiene las mismas CDR que el anticuerpo 1A4.

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

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de CD141 como un 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 madre y humanas durante el desarrollo y en la madurez.

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

10 Una "célula progenitora ótica" como se usa en este documento 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 se empuja para diferenciarse en una célula auditiva relacionada, como células similares a células capilares o 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. 15 Los métodos actuales de identificación pueden incluir una serie de factores de transcripción utilizados como marcadores moleculares, como PAX2, PAX8, FOXG1, SOX2, por nombrar algunos. Las células progenitoras óticas se encuentran *in vivo*, durante el desarrollo fetal, en el código ocular, el otocisto y en la región prosensorial de los posibles epitelios sensoriales. Su presencia en el oído adulto y maduro aún está bajo debate. Algunas células de soporte, sin embargo, pueden tener propiedades similares a progenitoras. Como se usa 20 en este documento, la solicitud describe aspectos relacionados con los progenitores óticos humanos. Sin embargo, también se puede entender que todos los aspectos descritos en el presente documento en relación con los progenitores óticos humanos se refieren a mamíferos de manera más general. 25

Se entiende que el término "marcador de superficie celular positivo" utilizado aquí significa un marcador, tal como una molécula, que se encuentra en la superficie de los progenitores óticos y se puede usar, quizás con otros marcadores, para verificar positivamente la identidad de los progenitores óticos. La referencia al "marcador de 30 superficie celular positivo" o "marcador celular positivo" en el presente documento pretende hacer referencia a uno de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 o GD2.

El término "marcador de superficie celular negativo" utilizado en este

documento significa un marcador, 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 progenitores no óticos. La referencia al "marcador de superficie celular negativo" o "marcador de célula negativo" en el presente documento se refiere a CD141.

El término "enriquecer" o "enriquecido" utilizado en este documento pretende significar que la proporción de células progenitoras óticas aumenta en una población de células en relación con las células progenitoras no óticas. El enriquecimiento puede considerarse de otro modo como clasificación de células progenitoras óticas de células progenitoras no óticas. En el enriquecimiento, las células progenitoras óticas se pueden aislar de células progenitoras no óticas o viceversa.

La invención no excluye el uso de los marcadores celulares descritos en este documento en combinación con otros marcadores celulares conocidos o futuros identificados.

"Específica" o "unión específica" se usa generalmente para referirse a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica y, por ejemplo, tiene menos de aproximadamente 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, está configurado para unirse a dicho marcador sin una unión significativa de otras moléculas. Cuando el contexto lo permite, los términos "dispuestos para unirse" y "específicamente unido" se pueden usar de manera intercambiable.

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

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

EJEMPLOS

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

5

Purificación de progenitores óticos a partir de poblaciones celulares heterogéneas

Introducción

10

La necesidad de una purificación prospectiva de los progenitores óticos

Los protocolos optimizados para dirigir las hPSC producen (en el mejor de los casos) poblaciones de células con una alta representación del tipo de células deseado debido a una serie de limitaciones clave en nuestra capacidad para controlar las células madre. Los problemas tales como los cultivos de partida heterogéneos, la variación de lote a lote en los factores de crecimiento, los consumibles medios y otros, 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 que son los propios progenitores. Actualmente, los experimentos de diferenciación ótica se limpian manualmente para purificar a los progenitores, lo que implica eliminar los tipos de células no deseados en función de la morfología y/o la expresión de los genes reportero. Si bien este enfoque ha sido eficaz para facilitar la diferenciación de las células neuronales/células capilares de flujo descendente, es laborioso y propenso a trasladar una pequeña proporción de tipos de células no progenitoras. Por lo tanto, para que las terapias con células madre avancen hacia aplicaciones clínicas, se requiere un método objetivo más preciso que se pueda escalar a un gran número de células.

La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es una técnica comúnmente utilizada para separar sub-grupos de células dentro de una población en base a la expresión diferencial de los marcadores de la superficie celular. El método requiere la identificación de perfiles de expresión de proteínas de la superficie celular únicas en las

células que se van a clasificar de una población heterogénea, combinada con la disponibilidad de anticuerpos adecuados para esas proteínas. Se han seleccionado los anticuerpos que se sabe que se adhieren a los antígenos de la superficie celular en cultivos de hESC que se han sometido a una diferenciación óptica para identificar candidatos para su uso en FACS para purificar progenitores óticos.

Se han desarrollado protocolos para dirigir las hPSC a lo largo de los linajes de diferenciación óptica hacia los fenotipos de las neuronas sensoriales y de las células capilares a través de estados intermedios denominados "progenitores óticos". Los protocolos utilizados para derivar progenitores óticos implican la inducción de FGF con FGF3 y FGF10 (figura 1a y Chen et al 2012), y un método más reciente que incorpora la manipulación de la señalización de WNT, agregando una etapa de inhibición de WNT (utilizando IWR-1-endo) seguido por la inducción de WNT (con BIO) (figura 1b).

Se ha realizado una selección de anticuerpos en poblaciones celulares heterogéneas resultantes de los dos protocolos anteriores en un esfuerzo por encontrar marcadores de superficie celular adecuados que puedan usarse para purificar las poblaciones progenitoras óticas a través de FACS.

Métodos y Resultados

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

1. Selección piloto utilizando anticuerpos CSCB. Línea reportero H14-NOP-SOX2 y protocolo WNT utilizado.
2. Selección principal que utiliza el panel de selección de marcadores de superficie celular humana de BD Lyoplate con 242 anticuerpos. Línea H14s9 y protocolo WNT utilizado. (3 placas replicadas)
3. Análisis principal que utiliza el panel de selección de marcadores de superficie celular humana de BD Lyoplate con 242 anticuerpos. Línea Shef3.2 y protocolo FGF utilizado. (2 placas replicadas)

Después de las imágenes, los datos se procesaron con el software Developer

Toolbox y se analizaron con Excel y SPSS.

Los tres experimentos se resumen en el cuadro 1.

CUADRO 1

5 **'PILOTO' se realizó con el panel de anticuerpos CSCB, la 'CORRIDA BD' se realizó con el panel de selección del Marcador de Superficie de Células Humanas BD Lyoplate.**

	PILOTO	CORRIDA BD 1	CORRIDA BD 2
LÍNEA	H14-NOP-SOX2	H14s9	Shef3.2
PLACAS REPLICADAS	2	3	2

1.1 Análisis piloto utilizando el Panel de Anticuerpos CSCB-Sheffield

10 La fase inicial de la selección utilizó un panel relativamente pequeño de anticuerpos disponibles en el Centro de Biología de Células Madre en Sheffield (Cuadro 2).

CUADRO 2

15 **Panel del Centro de anticuerpos de Biología de Células Madre utilizados para la selección inicial**

Panel de anticuerpos CSCB
P3X AG (control -ve) TRA-1-85 (control +ve) 480-1-1 (también conocido como SSEA1, CD15) 813-70 (también conocido como SSEA4) TRA-1-60s TRA-1-81 TRA-2-49/6E ME20.4 (también conocido como P75) B159 TRA-2-10 VINIS 53 ME311 HNK-1 VIN2 PB22 (también conocido como GD2) VINIS 56 (también conocido como GD3) A2B5

Una línea de reportero HESC que expresa EGFP impulsado por un

potenciador de SOX2 específico para el código de placa nasal y ótico se diferenció utilizando el protocolo "WNT" (figura 1b). La tinción en vivo se llevó a cabo utilizando el panel de anticuerpos al final de la inducción ótica (~12 días), y luego las células se fijaron antes de sondear con Hoechst y se tomaron imágenes utilizando un sistema automatizado de microscopía (IN Cell Analyzer 2200, GE Healthcare). Usando el software Developer, las células individuales se identificaron según la expresión de Hoechst, luego se registró la intensidad de fluorescencia de GFP (reportero SOX2 dentro de las células) y Alexa 568 (el fluorocromo unido al anticuerpo secundario usado contra los anticuerpos marcadores de superficie celular) y se utilizó para definir la expresión positiva en cada célula. La positividad se definió como una intensidad de fluorescencia más alta que la observada en IgG no reactiva, pozos de control negativo (IgG producidas por la línea P3X63Ag8 del mieloma parental).

Se utilizaron dos placas de 96 pozos en esta selección primaria que varió solo ligeramente en el método de tinción: la placa 1 se tiñó de acuerdo con el protocolo de bioimagen BD Lyoplate utilizando FBS al 5% en DMEM como medio de crecimiento con anticuerpos agregados y la placa 2 según la placa 1 pero con FBS al 5% en PBS (con CaCl_2 y MgCl_2) en lugar del medio de crecimiento.

En el panel de anticuerpos de CSCB se revelaron varios posibles aciertos. La figura 2 muestra los datos de este experimento que se muestran con cada anticuerpo en un panel separado, el eje x se refiere a la intensidad de fluorescencia del reportero 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 abajo en función de la proporción de células positivas para el marcador de superficie celular, siendo la parte superior izquierda la más positiva y la inferior derecha la menos positiva. TRA-1-85 es un anticuerpo de control positivo, P3X es un anticuerpo de control negativo. Los mejores aciertos se encuentran en la primera columna hasta los candidatos más pobres en la última.

Un método de análisis diferente basado en el porcentaje de células positivas en cada pozo y el número de pozos replicados por anticuerpo con un puntaje positivo en umbrales $>25\%$ o $>10\%$ confirmaron los tres principales aciertos como SSEA1, GD3 y TRA-2 -49, con SSEA4 (813-70) inmediatamente debajo.

Hubo poca diferencia entre las incubaciones de anticuerpos realizadas en PBS o en DMEM, por lo que se eligió DMEM para futuros experimentos, ya que forma un

componente del medio de diferenciación en el que las células crecen durante la inducción ótica. No se encontró que la tinción en vivo afecte adversamente a las células de ninguna manera obvia (es decir, no haya desprendimiento adicional de células durante el protocolo), y se recomienda en los métodos de BD Lyoplate ya que la fijación previa puede dar lugar a resultados falsos. La tinción en vivo también sería más apropiada para futuras aplicaciones cuando se necesiten progenitores en vivo para manipulaciones adicionales.

1.2 Verificación inicial de aciertos del panel CSCB

Los anticuerpos SSEA-1 y GD3 se eligieron para verificar que se unen efectivamente a la subpoblación progenitora ótica. Para liberar el canal de GFP en el microscopio, se volvió a la línea hESC paterna desde la cual se generó el reportero, H14s9. Las células se diferenciaron de la misma forma que en la selección primaria y luego se tiñeron en vivo con anticuerpos SSEA-1 y GD3 (en múltiples pozos separados, es decir, sin observar la co-expresión de las proteínas de la superficie). Luego, las células se fijaron y se permeabilizaron de modo que se pudieran sondear los marcadores óticos nucleares (transcripción), PAX2, SOX2 y FOXG1. Hoechst se utilizó de nuevo para identificar los núcleos de las células individuales. Se utilizaron los mismos métodos de recolección y análisis de datos que en la selección principal. Estos datos indican que la población SSEA1 positiva es un subconjunto de las células positivas para cada uno de los tres factores de transcripción (Cuadro 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 (Cuadro 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 de células deseado que el SSEA1. Vea la figura 3.

25

CUADRO 3i

Porcentaje de células positivas para los 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
------------	-----	------	-----	------

CUADRO 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

5 **2.1 Selección del panel de anticuerpos BD Lyoplate**

El trabajo con el Panel de Anticuerpo CSCB demostró la viabilidad de utilizar el método de bioimagen automático para seleccionar marcadores de superficie celular y permitió una optimización completa del sistema antes de realizar una selección más completa basada en el Panel de Selección de Marcadores de Superficie Celular Humana BD Lyoplate (BD Biosciences). Este panel analiza la unión de 242 anticuerpos y se esperaba que extendiera el número de marcadores identificados.

La selección BD lyoplate permite ejecutar 5 repeticiones en placas de 96 pozos. Se dividió el experimento en dos. Se realizaron tres réplicas utilizando la línea celular H14s9 diferenciada usando el protocolo WNT, mientras que las dos restantes usaron la línea celular Shef3.2 con el protocolo FGF. Este diseño experimental, por lo tanto, incluyó 5 réplicas totales, cubriendo 2 líneas celulares independientes y 2 protocolos de diferenciación diferentes. Se creyó que esto maximizaría las posibilidades de sacar a los mejores candidatos para los marcadores de superficie progenitores óticos.

Después de procesar los datos, se realizó un análisis para identificar el número total de células en el pozo y las que se consideran positivas. El umbral positivo se calculó placa por placa a través del análisis del pozo A1, que se define como un control (libre de anticuerpos primarios) en cada placa. El porcentaje de células positivas se calculó para cada pozo. Estos datos se recopilaron para cada una de las 3 placas de anticuerpo BD, es decir, 5 réplicas para cada placa, 3 para H14s9 y 2 para SHef3.2.

25 Luego se emplearon dos tipos diferentes de análisis, primero utilizando

criterios objetivos basados en la intensidad y luego utilizando criterios subjetivos basados en la morfología.

Análisis objetivo de los umbrales de etiquetado

- 5 1. Se le dio a cada pozo un valor de porcentaje positivo y se enumeraron las 5 réplicas de lado a lado para la comparación.
2. Las células que eran <10% positivas se clasificaron como negativas, $\geq 10\%$ se clasificaron como positivas.
3. IF 3 o más pozos replicados fueron negativos, entonces el pozo y el
10 anticuerpo correspondiente se clasificaron como no candidatos y se eliminaron de la consideración futura.
4. Si los 4 o 5 pozos son >80% positivos, se considera que el anticuerpo no es lo suficientemente discriminatorio (es decir, se une a demasiados tipos de células) y, por lo tanto, se clasifica como no candidato y se elimina de la consideración
15 futura.
5. Se comprobó que los pozos restantes tuvieran un mínimo de 3 réplicas positivas que abarcan las dos líneas celulares, es decir, si las réplicas 1-3 son positivas (las réplicas H14s9) pero 4 y 5 son negativas (las réplicas de Shef3.2), entonces el pozo debería estar excluido ya que esto sugiere que el anticuerpo se une específicamente a
20 una línea (o posiblemente solo a las células que se han sometido a una diferenciación a través del protocolo WNT en oposición al protocolo FGF).

La figura 4 muestra recortes de parte de los datos de la placa 1 utilizados para ilustrar cómo se implementaron los criterios explicados anteriormente. Se muestran los datos para los pozos F5 a G6 y los datos de porcentaje se han formateado de manera tal
25 que cuanto mayor sea el porcentaje, más oscuro será el sombreado, para que sea 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 pozos descritos caen en la 3 o más repeticiones negativas (punto 3 anterior) y, por lo tanto, se eliminan como no candidatos. En la figura 4b, los
30 pozos descritos caen en la categoría insuficientemente discriminatoria (punto 4 anterior) y, por lo tanto, se eliminan como no candidatos. En la figura 4c, los pozos descritos se incluyen en la categoría de enlace específica de línea/protocolo (punto 5 anterior), por lo

que también se eliminan como no candidatos.

Análisis subjetivo basado en la morfología

Una vez que se eliminaron todos los pozos no candidatos, se volvió a los
5 datos de la imagen y se verificó los pozos restantes para ver si el anticuerpo en realidad se
unía a la población que se clasificaría como progenitores óticos solo por su morfología. Este
análisis solo se realizó en las réplicas de Shef3.2, ya que el H14s9 era demasiado
confluyente para medir las morfologías a simple vista.

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

Además, se identificó a CD141 como un marcador de exclusión, ya que
15 marca la mayoría de los otros tipos de células, pero no los progenitores.

Métodos para las figuras 6 y 7

Se fijaron fetos humanos de diferentes edades gestacionales durante dos
horas en PFA al 4% en PBS a 4°C. Las muestras fueron luego crioprotegidas en una serie
20 ascendente de sacarosa al 5%-30% en PBS y se incluyeron en Cryo-M-Bed (Bright), antes
de congelarlas en iso-pentano líquido enfriado en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones
en serie 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 regulador de pH de bloqueo (suero de burro normal 5% Triton al 0.1% en PBS)
25 a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD141 (Biolegend) y anti-
neurofilamento 200 (Sigma). Las señales se visualizaron utilizando anticuerpos secundarios
conjugados a Alexa. La contra-tinción nuclear se realizó con DAPI (Sigma).

Métodos para las figuras 8 y 9

30 Las hESC de la línea Shef3.2 fueron inducidos a diferenciarse en progenitores
óticos durante 14 días usando el "protocolo FGF", como se describe en [1]. En esta etapa,
las células no fijadas se marcaron con los anticuerpos SSEA4, TRA-2-49 y CD141,

conjugados directamente con fluorocromos Alexa 647, Alexa 488 o Brilliant Violet 421 respectivamente (Biolegend). Las células se separaron y analizaron utilizando un BD FACSJazz.

5 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 capilares, utilizando un sistema de cultivo de organoides (3D) desarrollado en nuestro laboratorio. La diferenciación en células similares a células capilares también podría lograrse utilizando un método publicado (por ejemplo, [2]). Se extrajo el ARN y se analizó la expresión génica mediante qPCR utilizando un método DD-Ct.

10 Estos resultados sugieren que la población positiva doble SSEA4+/TRA2-49+ contiene células progenitoras capaces de diferenciarse en el linaje de las células capilares, incluso cuando se aíslan de la fracción positiva doble no-SSEA4/TRA2-49 (células positivas únicas o -/-). La población no clasificada aún podía diferenciarse, dado que contiene un porcentaje relativamente grande de células SSEA4+/TRA2-49+ ($54.8 \pm 5.6\%$, media $\pm$ s.e.m.).
15

Referencias

[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.
20 "*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.