

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 46424 B1** (51) Cl. internationale : **G01N 33/569**

(43) Date de publication :
29.07.2021

(21) N° Dépôt :
46424

(22) Date de Dépôt :
14.09.2017

(30) Données de Priorité :
15.09.2016 GB 20160015714

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/GB2017/052707 14.09.2017

(71) Demandeur(s) :
The University Of Sheffield, Firth Court Western Bank Sheffield S10 2TN (GB)

(72) Inventeur(s) :
RIVOLTA, Carlos Marcelo Nicolas ; BODDY, Sarah Louise

(74) Mandataire :
MOROCCO INTELLECTUAL PROPERTY SERVICES

(86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation: EP17771536.4

(54) Titre : **IDENTIFICATION ET ISOLATION DE PROGÉNITEUR OTIQUE HUMAIN**

(57) Abrégé : La présente invention concerne de manière générale l'identification et l'isolement de cellules progénitrices otiques humaines. Plus spécifiquement, la présente invention concerne un procédé d'utilisation de marqueurs cellulaires pour identifier et isoler des cellules progénitrices otiques humaines à partir d'une population mixte de cellules, des procédés d'enrichissement et de production de cellules progénitrices otiques humaines, et des kits associés destinés à être utilisés dans l'identification et/ou l'isolement de cellules progénitrices otiques humaines, les marqueurs cellulaires étant choisis parmi SSEA1 (CD15), le disialoganglioside GD3, la TRA-2-49 (foie/os/phosphatase alcaline rénale), SSEA4, le ganglioside GD2 et le CD141.

REVENDEICATIONS

1 - Procédé *in vitro* d'identification de cellules progénitrices otiques humaines dans une population mixte de
5 cellules comprenant la détermination de savoir si une cellule a au moins deux marqueurs de surface cellulaire choisis parmi SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 et CD141.

2 - Procédé selon la revendication 1, dans
10 lequel :

- a) les marqueurs cellulaires SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4 et GD2 sont des marqueurs cellulaires positifs ; et / ou
- b) le marqueur cellulaire CD141 est un marqueur cellulaire négatif.

15

3 - Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel :

- (a) au moins deux marqueurs cellulaires positifs sont utilisés en combinaison pour identifier des progéniteurs
20 otiques humains ; ou
- (b) au moins trois, quatre ou cinq marqueurs cellulaires positifs sont utilisés en combinaison pour identifier des progéniteurs otiques humains ; ou
- (c) un marqueur cellulaire positif, ou au moins deux
25 marqueurs cellulaires positifs, sont utilisés en combinaison avec le marqueur cellulaire négatif CD141.

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la population mixte
30 de cellules est fournie à partir de, ou pendant, un protocole de différenciation de cellules souches pluripotentes *in vitro*, facultativement dans lequel les

cellules souches pluripotentes sont des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ; ou

dans lequel la population mixte de cellules est fournie à partir de, ou pendant, des procédures de
5 dédifférenciation, de trans-différenciation ou de reprogrammation directe en des lignées cellulaires totipotentes humaines ; ou

dans lequel la population mixte de cellules est fournie à partir de tissu, facultativement dans lequel les
10 cellules sont des échantillons cochléaires ou vestibulaires obtenus à partir d'interventions chirurgicales sur des oreilles internes d'adultes.

5 - Procédé selon l'une quelconque des
15 revendications précédentes, dans lequel la population mixte de cellules est mise en contact avec un ou plusieurs éléments de liaison conçus pour se lier aux marqueurs cellulaires, facultativement dans lequel l'élément de liaison comprend un anticorps, un fragment d'anticorps ou
20 un mimétique de celui-ci.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant une étape de détection, dans lequel les marqueurs cellulaires sont
25 détectés comme présents ou non présents sur une cellule ou un groupe de cellules, facultativement dans lequel la détection comprend l'utilisation de FACS et/ou l'utilisation de MACS.

30 7 - Procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, dans lequel l'élément de liaison est marqué pour l'identification, facultativement dans lequel le marqueur comprend un fluorophore.

8 - Procédé *in vitro* d'identification de cellules progénitrices otiques humaines dans une population mixte de cellules à l'aide d'au moins deux marqueurs de surface cellulaire choisis parmi SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 et CD141, le procédé comprenant :

- fournir des éléments de liaison spécifiques d'au moins deux marqueurs cellulaires différents ;
- mettre en contact la population mixte de cellules avec les éléments de liaison ; et
- détecter la liaison ou la non-liaison des éléments de liaison aux cellules dans la population mixte de cellules.

9 - Procédé selon la revendication 8, dans lequel le procédé comprend en outre la détermination qu'une cellule est une cellule progénitrice otique humaine si :

a) des éléments de liaison conçus pour se lier aux marqueurs cellulaires positifs se lient à au moins deux marqueurs cellulaires positifs différents sur la cellule ;
ou

b) un élément de liaison conçu pour se lier à l'un des marqueurs cellulaires positifs se lie à au moins l'un des marqueurs cellulaires positifs sur la cellule, et un marqueur de liaison conçu pour se lier au marqueur cellulaire négatif CD141 ne se lie pas à la cellule, facultativement dans lequel le procédé comprend la détermination qu'une cellule est une cellule progénitrice otique humaine si :

i) des éléments de liaison conçus pour se lier aux marqueurs cellulaires positifs se lient à au moins trois marqueurs cellulaires positifs différents sur la cellule ;
ou

ii) des éléments de liaison conçus pour se lier à au moins deux marqueurs cellulaires positifs différents se lient aux au moins deux marqueurs cellulaires positifs différents sur la cellule, et un marqueur de liaison conçu
5 pour se lier au marqueur cellulaire négatif CD141 ne se lie pas à la cellule.

10 - Procédé *in vitro* d'enrichissement en cellules progénitrices otiques humaines à partir d'une
10 population mixte de cellules, le procédé comprenant:

- identifier les cellules progénitrices otiques humaines selon le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 9 ; et
- trier les cellules de telle sorte que les cellules
15 progénitrices otiques humaines soient isolées des cellules progénitrices non otiques, de telle sorte que les cellules progénitrices otiques humaines sont enrichies dans la population,
facultativement dans lequel le tri comprend FACS et/ou
20 comprend MACS.

11 - Procédé *in vitro* de production d'une population de cellules progénitrices otiques humaines, le procédé comprenant :

- 25 - différencier les cellules progénitrices non otiques en cellules progénitrices otiques humaines, par lequel certaines cellules progénitrices non otiques peuvent rester dans la population pour former une population mixte de cellules ; et
- 30 - enrichir les cellules progénitrices otiques humaines à partir de la population mixte de cellules selon le procédé de la revendication 10.

12 - Kit comprenant au moins deux éléments de liaison différents, dans lequel les éléments de liaison sont conçus pour se lier à différents marqueurs cellulaires choisis parmi SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 et CD141, facultativement dans lequel le kit comprend au moins trois éléments de liaison différents, dans lequel les éléments de liaison sont conçus pour se lier à différents marqueurs cellulaires choisis parmi SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 et CD141.

10

13 - Kit selon la revendication 12, dans lequel le kit comprend un panel d'éléments de liaison, dans lequel le panel d'éléments de liaison comprend un élément de liaison spécifique pour chacun des marqueurs cellulaires de SSEA1, GD3, TRA-2-49, SSEA4, GD2 et CD141.

15

14 - Kit selon la revendication 12 ou la revendication 13, dans lequel les éléments de liaison sont des anticorps, facultativement dans lequel les anticorps sont marqués.

20

15 - Utilisation de CD141 comme marqueur cellulaire négatif pour identifier des cellules progénitrices non otiques humaines dans une population mixte de cellules.

25