



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
ISTITUTO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

(11) **CH 711 966 A2**

(51) Int. Cl.: **C12N 5/074** (2010.01)
A61K 35/30 (2015.01)

Domanda di brevetto per la Svizzera ed il Liechtenstein

Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

(12) **DOMANDA DI BREVETTO**

(21) Numero della domanda: 01907/15

(71) Richiedente:
Roberto Pinelli, via Zorzi, 15
6900 Lugano (CH)

(22) Data di deposito: 23.12.2015

(72) Inventore/Inventori:
Roberto Pinelli, 6952 Canobbio (CH)

(43) Domanda pubblicata: 30.06.2017

(74) Mandatario:
MODIANO & PARTNERS S.A., Via E. Bossi 1
6900 Lugano (CH)

(54) **Cellule staminali retinali.**

(57) La presente invenzione si riferisce a cellule staminali isolate dalle regioni ora terminalis ed ora serrata della retina, al metodo per l'isolamento di dette cellule staminali ed al loro uso nel trattamento di malattie ed altre condizioni patologiche che colpiscono gli occhi.

Descrizione**Campo tecnico**

[0001] La presente invenzione si riferisce a cellule staminali isolate da regioni specifiche della retina, al procedimento per l'isolamento di dette cellule staminali ed al loro uso nel trattamento di malattie ed altre condizioni patologiche che colpiscono gli occhi.

Tecnica di fondo

[0002] La perdita di visione può essere causata da malattie o danni alla retina oppure all'occhio. Per esempio, il processo infettivo come l'infezione della retina da citomegalovirus può portare a perdita del campo visivo, diminuita acutezza visiva e cecità. Anche processi infiammatori come uveiti possono influenzare la retina e possono portare a diminuzione dell'acutezza visiva. Il cancro della retina, come per esempio il retinoblastoma, peggiora anche la visione. Altre malattie possono verificarsi attraverso la degenerazione maculare legata all'età. Molte differenti malattie genetiche come rinite pigmentosa portano a danneggiamenti retinali e cecità, nonché ad altri tipi di degenerazione retinale (distrofie retinali). I danni fisici alla retina possono anche derivare dal distacco della retina che porta alla degenerazione retinale e alla cecità.

[0003] Terapie disponibili per il trattamento della perdita di visione causata da danneggiamento retinale rimangono limitate.

[0004] Dette terapie spesso comportano interventi chirurgici e/oppure trapianto di tessuto, esponendo in tal modo il soggetto colpito al rischio di reazioni avverse, che nel caso del trapianto di tessuto possono comprendere il rischio di reazioni a corpi estranei e rigetto del trapianto. Inoltre, invece di curare oppure correggere la malattia sottostante, molte terapie disponibili trattano semplicemente oppure mascherano i sintomi di tali malattie. Rimane una necessità di nuove terapie per il trattamento di malattie ed altre condizioni patologiche che colpiscono gli occhi e particolarmente necessarie sono terapie in grado di correggere efficacemente e permanentemente tali malattie oppure condizioni patologiche. Sono pure necessarie terapie che siano in grado di minimizzare l'incidenza di reazioni avverse.

[0005] Ora terminalis e ora serrata sono parti differenti della retina, sebbene vicine e collegate, vedere fig. 1. Ora serrata («serrata» dal latino indica «chiusa») rappresenta la congiunzione tra la retina funzionale e la ora terminalis («terminalis» dal latino indica «parte finale»). Ora terminalis è il bordo più eccentrico della retina (Holden et al., Retinal Magnification Factor at the Ora Terminalis: A Structural Study of Human and Animal Eyes, Vision Res. 27: 1229–1235, 1987); ora terminalis è disposta anteriormente a ora serrata e posteriormente alla pars plana, che è parte dell'uvea. Ora terminalis e ora serrata sono la parte germinativa della retina neurale nell'adulto e rappresentano il residuo superstite dello strato germinale neuroepiteliale embrionale che una volta copriva l'intera retina neurale presuntiva.

[0006] Ora terminalis e ora serrata di pesci, anfibi e volatili sono zone proliferative descritte in varie pubblicazioni. Nei pesci e negli anfibi, la neurogenesi non cessa dopo lo stadio embrionale, ma continua ad operare attraverso tutta la vita dell'animale. Cellule staminali isolate da ora terminalis di pesci oppure anfibi nonché cellule staminali isolate da ora serrata di uccelli, sono state descritte, per esempio da: Amato et al., Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences, Int. J. Dev. Biol. 48: 993–1001, 2004; Cervený et al., Continued Growth and Circuit Building in the Anamniote Visual System, Develop. Neurobiol. 72: 328–345, 2012).

[0007] La zona ai limiti del campo retinale adiacente la ora terminalis, è stata pure largamente studiata nei mammiferi e nelle specie aviarie nel contesto di uno studio sull'ingrandimento. Le misurazioni anatomiche della ora serrata nell'uomo e della ora terminalis in scimmie, gatti, piccioni, mucche e suini sono state fatte come base per il calcolo dei fattori di ingrandimento rispettivamente della ora serrata e terminalis. Nell'occhio umano e di scimmia, l'ingrandimento all'estrema periferia del campo retinale è stato trovato sostanzialmente minore di quello in corrispondenza del polo posteriore; nel gatto, coniglio, ratto e topo vi è una minore riduzione; nei piccioni, allodole e storni, l'ingrandimento è molto simile all'estrema periferia ed al polo posteriore. (Holden et al., Retinal Magnification Factor at the Ora Terminalis: A Structural Study of Human and Animal Eyes, Vision Res. 27: 1229–1235, 1987).

[0008] È noto che le cellule staminali retinali sono presenti nella retina del mammifero adulto; specificamente le cellule staminali retinali sono state trovate nel margine cigliare dell'epitelio pigmentoso retinale (vedere US 6 117 675 e Coles et al., PNAS 101(44):15772–15777, 2004) e nello strato retinale neurale (vedi WO 01/58 460).

[0009] Tuttavia, l'isolamento delle cellule staminali da ora terminalis e ora serrata di mammiferi adulti non è mai stato descritto.

Sommario dell'invenzione

[0010] Gli attuali trattamenti con le cellule staminali retinali sono inadeguati per ripristinare la visione persa quando le cellule retinali sono danneggiate, cosicché le potenziali applicazioni cliniche di cellule staminali retinali sono ancora molto alte.

[0011] Anatomicamente, cellule isolate più profondamente nella retina funzionale hanno minore probabilità di essere fonte di cellule staminali.

[0012] Sorprendentemente, la Richiedente ha isolato cellule staminali retinali dalle regioni ora terminalis e ora serrata della retina di mammiferi adulti. Le cellule staminali isolate dalla Richiedente sono in grado di produrre cellule multipotenti per tutta la vita nei mammiferi adulti, e rappresentano un pre-passaggio alla retina funzionale.

[0013] La cellula staminale retinale della ora terminalis (OTRSC) e della ora serrata (OSRSC) oggetto della presente invenzione è in grado di crescere e germinare in cellule staminali retinali neurali, in modo analogo a quanto avviene in un albero il quale cresce mediante stratificazioni di anelli circolari di cellule attorno alla circonferenza del suo tronco. Detta OTRSC e OSRSC è in grado di supportare la sostituzione di cellule retinali e la ricrescita sia in umani adulti sani che in umani con malattie retinali.

[0014] US 6 117 675 e Coles et al., (2004) precedentemente citati descrivono cellule staminali retinali isolate dalla regione del margine cigliare della retina di mammiferi, cioè una regione molto lontana dalla ora terminalis e ora serrata; inoltre, le cellule retinali lì descritte sono cellule progenitrici e quindi unipotenti ed in grado soltanto di produrre una progenie che dà origine ad un singolo tipo di cellula retinale neurale differenziata.

[0015] WO 01/58 460 precedentemente citato descrive cellule staminali retinali isolate da una regione anatomicamente indistinta di tessuto retinale neurale di mammiferi; l'isolamento dalle regioni ora terminalis oppure ora serrata della retina non è menzionato in tale domanda di brevetto.

[0016] Al contrario, le cellule staminali retinali descritte nella presente invenzione sono state isolate da regioni anatomicamente distinte, vale a dire rispettivamente dalle regioni ora terminalis e ora serrata della retina di mammiferi adulti, e sono multipotenti. Il primo oggetto della presente invenzione è quindi una cellula staminale retinale isolata, in cui detta cellula staminale retinale è isolata dalla regione ora terminalis e/oppure ora serrata della retina di un mammifero post-natale.

[0017] Il secondo oggetto della presente invenzione è un metodo per isolare una cellula staminale retinale da un mammifero post-natale, in cui il metodo comprende le fasi di:

- (a) dissociare tutta oppure parte della ora terminalis e/oppure ora serrata dall'occhio di un soggetto,
- (b) coltivare detta ora terminalis e/oppure ora serrata dissociata in un mezzo conduttivo alla formazione di sfere e/oppure gruppetti (cluster) di cellule comprendenti cellule staminali retinali,
- (c) disporre le sfere risultanti e/oppure i cluster di cellule in un mezzo comprendente gli enzimi tripsina e ialuronidasi,
- (d) bloccare gli enzimi con uno o più inibitori, e
- (e) isolare le cellule staminali retinali risultanti dalle sfere e/oppure dai cluster di cellule risultanti. Il terzo oggetto della presente invenzione è una cellula staminale retinale isolata ottenuta con il metodo sopra descritto.

[0018] Il quarto oggetto della presente invenzione è una composizione farmaceutica comprendente

- una cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure ottenuta con il metodo sopra descritto, e/oppure la sua progenie, e
- almeno un veicolo e/oppure eccipiente farmaceuticamente accettabile.

[0019] Il quinto oggetto della presente invenzione è la cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure la cellula staminale retinale isolata ottenuta con il metodo sopra descritto, e/oppure la sua progenie, per uso come medicamento.

[0020] Il sesto oggetto della presente invenzione è la cellula staminale retinale isolata come sopra definita o la cellula staminale retinale isolata ottenuta con il metodo sopra descritto, e/oppure la sua progenie per uso nel trattamento di una malattia o una condizione patologica oftalmica.

[0021] Il settimo oggetto della presente invenzione è l'uso della cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure della cellula staminale retinale isolata ottenuta con il procedimento sopra descritto, e/oppure della sua progenie per la produzione di un medicamento per il trattamento di una malattia oppure una condizione patologica oftalmica.

[0022] L'ottavo oggetto della presente invenzione è un metodo per il trattamento di una malattia oppure una condizione patologica oftalmica in un soggetto comprendente la fase di somministrazione a detto soggetto che ha bisogno di tale trattamento di una quantità efficace delle cellule staminali retinali isolate come sopra definite oppure cellule staminali retinali isolate ottenute mediante il metodo sopra descritto e/oppure la loro progenie.

Definizioni

[0023] Le cellule staminali retinali isolate dalla ora terminalis sono in questa sede indicate come «cellule staminali retinali ora terminalis» oppure «OTRSC». Dette OTRSC vengono isolate dall'occhio di un mammifero dal periodo che inizia dai primi tempi della vita post-natale e prosegue attraverso e, in certi casi oltre, l'ottava decade di vita.

[0024] Le cellule staminali retinali isolate dalla ora serrata sono in questa sede indicate come «cellule staminali retinali ora serrata» oppure «OSRSC». Dette OSRSC vengono isolate dall'occhio di un mammifero nel periodo che inizia dai primi tempi della vita post-natale e prosegue attraverso, ed in certi casi oltre, l'ottava decade di vita.

[0025] Come usato in questa sede il termine «isolato» si riferisce ad una separazione fisica o selezione di tali cellule dai loro tessuti nativi oppure dal loro ambiente. Analogamente, il termine «isolando» si riferisce generalmente alla separazione fisica oppure selezione di una o più cellule da un gruppo di cellule (per esempio una neurosfera), per esempio in base alle caratteristiche di tali cellule oppure all'espressione di uno o più marcatori cellulari o biologici. Come usato in questa

sede, il termine «mammifero» si riferisce a qualsiasi membro della classe dei mammiferi: umani, primati non umani come scimpanzé, ed altre specie di scimmie; animali da allevamento come bovini, cavalli, pecore, capre, suini; animali domestici come conigli, cani e gatti; animali da laboratorio compresi roditori, come ratti, topi e cavie, e simili.

[0026] Come usato in questa sede il termine «indifferenziato» si riferisce ad una cellula che non è ancora differenziata oppure altrimenti sviluppata in un tipo di cellula specializzata, le cellule staminali sono indifferenziate. Le cellule staminali indifferenziate mantengono la capacità di differenziarsi in uno o più tipi di cellule specializzate (per esempio cellule della retina neurale).

[0027] Come usato in questa sede il termine «multipotente» oppure «multipotenziale» si riferisce a cellule che sono in grado di produrre progenie che dà origine a ciascuno dei tipi principali di cellule differenziate del tessuto in cui queste si trovano. Le cellule staminali adulte sono multipotenti e sono in grado di produrre soltanto i derivati funzionali. Per esempio, cellule staminali retinali adulte sono multipotenti e come tali sono in grado di differenziarsi in una o più cellule retinali neurali specializzate (come per esempio cellule amacrine, cellule orizzontali/ off bipolari, bastoncelli fotorecettori, proteina del disco esterno del bastoncello, glia/astrociti di Muller, RPE, cellule pigmentate, glia neurale indifferenziata e di Muller, RPC ed amacrine, RPC e cellule a bastoncello bipolari). Come usato in questa sede il termine «unipotente» si riferisce a cellule che sono in grado di produrre soltanto un tipo di cellula, esse sono definite anche precursore.

[0028] Come usato in questa sede, il termine «progenie» si riferisce alle cellule specializzate derivanti da cellule staminali multipotenti.

[0029] Una quantità terapeuticamente efficace delle cellule staminali retinali isolate secondo il primo oggetto della presente invenzione può venire somministrata ad un soggetto dopo la determinazione che il soggetto abbia una malattia oppure una condizione indesiderata che può trarre beneficio dal trattamento con detto composto. Il personale medico o clinico può fare la determinazione come parte di una diagnosi di una malattia oppure condizione patologica in un soggetto. Il composto può anche venire usato nella prevenzione di tali condizioni, che possono venire considerate come riducenti la probabilità che un soggetto abbia una o più delle condizioni.

[0030] Come usato in questa sede, una «quantità terapeuticamente efficace» si riferisce ad una quantità sufficiente ad ottenere lo scopo previsto. La determinazione delle quantità efficaci rientra nella capacità degli esperti nel settore in base al raggiungimento di un effetto desiderato. Una quantità efficace dipenderà da fattori comprendenti, senza essere limitati a questi, la dimensione di un soggetto e/oppure il grado al quale la malattia o condizione indesiderata della quale il soggetto soffre è progredita. La quantità efficace dipenderà pure dal fatto che il composto venga somministrato al soggetto in una singola dose oppure periodicamente nel tempo. Le cellule staminali retinali isolate secondo il primo oggetto della presente invenzione sono destinate al trattamento di soggetti. Come usato in questa sede, il termine «soggetto» comprende mammiferi e non mammiferi. Esempi di mammiferi comprendono, senza essere limitati a questi, qualsiasi membro della classe dei mammiferi: umani, primati non umani come scimpanzé ed altre specie di scimmie; animali da allevamento come bovini, cavalli, pecore, capre, suini; animali domestici come conigli, cani e gatti; animali da laboratorio compresi roditori, come ratti, topi e cavie e simili. Esempi di non mammiferi comprendono, senza essere limitati a questi, volatili, pesci e simili. Detto soggetto, come inteso in questa sede, può essere in un periodo di vita dai primi tempi della vita post-natale fino ad oltre 8 decenni di vita. Il termine «trattamento» oppure «trattando» o «trattato» come usato nel presente documento comprende la cura oppure la risoluzione di un disturbo patologico per ottenere un beneficio terapeutico, con beneficio terapeutico si intende lo sradicamento oppure miglioramento del disturbo sottostante da trattare. Inoltre, un beneficio terapeutico è raggiunto con lo sradicamento oppure miglioramento di uno o più dei sintomi fisiologici associati con il disturbo sottostante, cosicché si osserva un miglioramento nel paziente, nonostante il fatto che il paziente possa essere ancora soggetto a disturbi sottostanti.

[0031] Come usato nel presente documento «malattia oppure condizione patologica oftalmica» comprende una malattia oppure condizione patologica di eziologia oftalmica nonché una malattia oppure condizione patologica avente un componente oftalmico che è secondario ad una malattia cardiovascolare oppure metabolica (come ipertensione, dislipidemia oppure diabete mellito).

[0032] L'articolo «un» e «uno», come usato in questa sede nella descrizione e nelle rivendicazioni, a meno che sia chiaramente indicato il contrario, deve essere inteso come comprendente i referenti plurali. Le rivendicazioni oppure descrizione che comprendono «oppure» tra uno o più membri di un gruppo, sono considerate soddisfatte se uno, più di uno, o tutti i membri del gruppo sono presenti in, impiegati in oppure altrimenti rilevanti per un dato prodotto oppure procedimento a meno che sia indicato il contrario o questo risulti altrimenti evidente dal contesto. L'invenzione comprende realizzazioni in cui esattamente un membro del gruppo è presente in, impiegato in oppure altrimenti rilevante per un dato prodotto oppure procedimento. L'invenzione comprende pure realizzazioni in cui più di uno, oppure tutti i membri del gruppo sono presenti in, impiegati in, oppure altrimenti rilevanti per un dato prodotto o procedimento. Inoltre, si comprenderà che l'invenzione comprende tutte le variazioni, combinazioni e permutazioni in cui una o più limitazioni, elementi, clausole, termini descrittivi, ecc., in una o più delle rivendicazioni elencate viene introdotto in un'altra rivendicazione dipendente della stessa rivendicazione (oppure, come rilevante, qualsiasi altra rivendicazione) a meno che sia altrimenti indicato oppure a meno che risulti evidente a chi ha una ordinaria esperienza nel settore che ne potrebbe derivare una contraddizione oppure inconsistenza. Quando elementi sono rappresentati come elenchi (nel gruppo Markush oppure simile formato), si comprenderà che tale sottogruppo di elementi è pure descritto, e qualsiasi elemento (i) può venire rimosso dal gruppo. Si comprenderà pure che,

in generale, quando l'invenzione, oppure aspetti dell'invenzione, è/sono riportati come comprendenti particolari elementi, caratteristiche, ecc., certe realizzazioni dell'invenzione oppure suoi aspetti consistono, oppure consistono essenzialmente in, tali elementi, caratteristiche, ecc. Per ragioni di semplicità queste realizzazioni non sono state specificamente indicate in ogni caso. Potrebbe pure intendersi che qualsiasi realizzazione oppure aspetto dell'invenzione può venire esplicitamente escluso dalla rivendicazioni, indipendentemente dal fatto che l'esclusione specifica sia indicata nella descrizione.

Descrizione della figura

[0033] La fig. 1 rappresenta un dettaglio del diagramma sagittale dell'occhio, in cui sono evidenziate le posizioni rispettive di ora serrata, ora terminalis e margine cigliare retinale.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

[0034] La presente invenzione provvede evidenza del fatto che i tessuti dell'occhio e, in particolare, gli strati epiteliali pigmentati e non pigmentati della regione della ora terminalis e della ora serrata della retina di un mammifero post-natale contengono cellule staminali retinali.

[0035] Le cellule staminali retinali della ora terminalis (OTRSC) e le cellule staminali retinali della ora serrata (OSRSC) descritte nella presente sono multipotenti ed isolate da una regione anatomicamente distinta della retina, quindi sono distinguibili da quelle cellule staminali retinali isolate dalle aree del margine cigliare (pars plana e pars plicata, parti della uvea) descritte in US 6 117 675 e da Coles et al. (2004), che sono cellule progenitrici e quindi unipotenti. WO01/58460 precedentemente citato descrive cellule staminali retinali isolate da una regione anatomicamente indistinta del tessuto retinale neurale di mammiferi; l'isolamento dalle regioni ora terminalis oppure ora serrata della retina non è menzionato in tale domanda di brevetto.

[0036] Il primo oggetto della presente invenzione è una cellula staminale retinale isolata, in cui detta cellula staminale retinale è isolata dalla regione ora terminalis e/oppure dalla regione ora serrata della retina di un mammifero post-natale.

[0037] In una realizzazione secondo il primo oggetto della presente invenzione, detta cellula staminale retinale è isolata da una regione della retina comprendente detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata; preferibilmente detta cellula staminale retinale è isolata da una regione della retina costituita da detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata; più preferibilmente detta cellula staminale retinale è isolata da una regione della retina costituita essenzialmente dal detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata; con la massima preferenza detta cellula staminale retinale è isolata da una regione della retina costituita esclusivamente da detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata e non è isolata da altre aree della retina.

[0038] Come usata in questa sede, l'espressione «essenzialmente da» indica che oltre il 75%, preferibilmente più dell'80%, più dell'85%, più del 90%, più del 95% della regione della retina dalla quale la cellula staminale retinale è isolata è costituita da ora terminalis e/oppure ora serrata.

[0039] Come usata in questa sede, l'espressione «esclusivamente da» indica che oltre il 96%, preferibilmente oltre il 99%, della regione della retina dalla quale la cellula staminale retinale è isolata è costituita da ora terminalis e/oppure ora serrata.

[0040] In una realizzazione secondo il primo aspetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC viene isolata dallo strato epiteliale pigmentato o non pigmentato; preferibilmente OTRSC e/oppure OSRSC viene isolata dallo strato pigmentato.

[0041] In un'altra realizzazione secondo il primo oggetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC isolata è una cellula staminale neurale.

[0042] In una realizzazione secondo il primo oggetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC viene isolata durante qualsiasi periodo della vita del soggetto, oppure in certi casi da un soggetto deceduto (per esempio dette OTRSC e/oppure OSRSC vengono isolate entro circa uno, due, tre, quattro, sei, otto, dodici, ventiquattro, trentasei, quarantotto oppure settantadue ore dal decesso del soggetto). Preferibilmente detto soggetto è un soggetto umano.

[0043] Preferibilmente dette OTRSC e/oppure OSRSC viene isolata da un soggetto umano dal periodo che inizia dai primi tempi della vita post-natale e prosegue attraverso, in certi casi oltre, l'ottava decade di vita. In una realizzazione secondo il primo oggetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC è indifferenziata e multipotente; preferibilmente detta OTRSC e/oppure OSRSC è multipotente ed in grado di differenziarsi in tutti i tipi differenti di cellule retinali neurali.

[0044] In un'altra realizzazione secondo il primo oggetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC non è una cellula progenitrice. In un'altra realizzazione secondo il primo oggetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC non è unipotente. Il secondo oggetto della presente invenzione è un metodo per isolare una cellula staminale retinale da un mammifero post-natale, in cui il metodo comprende le fasi di:

- (a) dissociare tutta oppure parte della ora terminalis e/oppure ora serrata dall'occhio di un soggetto,
- (b) coltivare detta ora terminalis e/oppure ora serrata dissociata in un mezzo conduttivo alla formazione di sfere e/oppure gruppetti (cluster) di cellule comprendenti cellule staminali retinali,
- (c) disporre le sfere risultanti e/oppure i cluster risultanti di cellule in un mezzo comprendente gli enzimi tripsina e ialuronidasi,

(d) bloccare gli enzimi con uno o più inibitori, e

(e) isolare le cellule staminali retinali risultanti dalle sfere e/oppure dai cluster di cellule risultanti. In una realizzazione secondo il secondo oggetto della presente invenzione, il soggetto è un mammi feroumano, per esempio un donatore oppure un cadavere. In un'altra realizzazione secondo il secondo oggetto della presente invenzione, il mezzo comprende uno o più fattori di crescita esogeni, in un'altra realizzazione detto mezzo non comprende fattori di crescita esogeni. In una realizzazione secondo il secondo oggetto della presente invenzione, le OTRSC e/oppure OSRSC vengono isolate dalle sfere corrispondenti risultanti e/oppure dai cluster di cellule con una frequenza di circa 1:500 o almeno 1:500 usando mezzi di routine come pipettaggio. Il terzo oggetto della presente invenzione è una cellula staminale retinale isolata ottenuta con il metodo sopra descritto.

[0045] Il quarto oggetto della presente invenzione è una composizione farmaceutica comprendente

– una cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure ottenuta con il metodo sopra descritto, e/oppure la sua progenie, e

– almeno un veicolo e/oppure eccipiente farmaceuticamente accettabile.

[0046] Si deve notare che la composizione farmaceutica secondo il quarto oggetto della presente invenzione può essere somministrata ad un soggetto attraverso qualsiasi via adatta di somministrazione, compresa una o più tra somministrazione oftalmica, intratecale, topica, transdermica, boccale, sublinguale, orale o parenterale. In una realizzazione secondo il quarto oggetto della presente invenzione, tale composizione farmaceutica può venire somministrata per inalazione, in un'altra realizzazione tale composizione farmaceutica viene somministrata mediante una iniezione intra-vitrea.

[0047] In una realizzazione secondo il quarto oggetto della presente invenzione, la composizione farmaceutica è una soluzione oppure una sospensione, preferibilmente adatta per somministrazione oftalmica, più preferibilmente adatta per somministrazione intra-vitrea; nel caso di somministrazione nel corpo vitreo, tale composizione può comprendere soluzione salina equilibrata oppure soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco.

[0048] Preferibilmente, secondo il quarto oggetto della presente invenzione, la composizione farmaceutica è una composizione acquosa comprendente le cellule isolate dell'invenzione e/oppure la loro progenie sospese in una soluzione salina equilibrata ad una concentrazione di almeno circa 10.000 cellule per 0,5 µl.

[0049] Preferibilmente, secondo il quarto oggetto della presente invenzione, la composizione farmaceutica è destinata all'iniezione intra-corpo vitreo.

[0050] Il metodo di preparazione della composizione farmaceutica oggetto della presente invenzione e la scelta dei veicoli farmaceuticamente accettabili e/oppure eccipienti sono descritti in dettaglio, per esempio, in L. William, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Ventesima edizione, Mack Publishing Company. Easton, PA, (2000).

[0051] Il quinto oggetto della presente invenzione è la cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure la cellula staminale retinale isolata ottenuta con il procedimento sopra descritto, e/oppure la sua progenie, per uso come medicamento.

[0052] Il sesto oggetto della presente invenzione è la cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure la cellula staminale retinale isolata ottenuta con il procedimento sopra descritto, e/oppure la sua progenie per uso nel trattamento di una malattia o condizione patologica oftalmica.

[0053] Il settimo oggetto della presente invenzione consiste nell'uso della cellula staminale retinale isolata come sopra definita oppure della cellula staminale retinale isolata ottenuta con il procedimento sopra descritto, e/oppure della sua progenie per la produzione di un medicamento per il trattamento di una malattia o condizione patologica oftalmica.

[0054] L'ottavo oggetto della presente invenzione è un metodo per il trattamento di una malattia oppure condizione patologica oftalmica in un soggetto, comprendente la fase di somministrazione a detto soggetto che ha bisogno di tale trattamento di una quantità efficace delle cellule staminali retinali isolate come sopra definite oppure cellule staminali retinali isolate ottenute mediante il metodo sopradescritto, e/oppure la loro progenie.

[0055] In una realizzazione secondo il sesto, settimo ed ottavo oggetto della presente invenzione, la malattia oppure condizione patologica oftalmica da trattare comprende, senza essere limitata a questa, una o più tra rinite pigmentosa, maculopatia, retinopatia diabetica, retinopatia ipertensiva e distrofie retinali. In una realizzazione secondo l'ottavo oggetto della presente invenzione, il soggetto è un mammifero, preferibilmente umano, più preferibilmente un adolescente umano.

[0056] In una realizzazione secondo l'ottavo oggetto della presente invenzione, il metodo di trattamento comprende la fase di somministrare la cellula isolata dell'invenzione, oppure la cellula staminale retinale isolata ottenuta mediante il metodo sopradescritto, e/oppure la sua progenie mediante iniezione intra-corpo vitreo.

[0057] In una realizzazione secondo l'ottavo oggetto della presente invenzione, il metodo di trattamento comprende un trapianto autologo in un soggetto della cellula isolata dell'invenzione, oppure della cellula staminale retinale isolata ottenuta mediante il metodo sopradescritto, e/oppure sua progenie; in tale realizzazione detta cellula isolata (OTRSC e/oppure OSRSC) è isolata dal soggetto, coltivata e successivamente trapiantata oppure reintrodotta nello stesso soggetto, così da minimizzare oppure eliminare il rischio di reazione avversa ad un corpo estraneo. In alternativa, in un'altra realizzazione secondo l'ottavo oggetto della presente invenzione, detta OTRSC e/oppure OSRSC è isolata da un donatore (come per

esempio un cadavere di mammifero) e successivamente trapiantata oppure somministrata (per esempio mediante iniezione intra-corpo vitreo) ad un soggetto per trattare una malattia oppure una condizione patologica oftalmica.

Sezione sperimentale

Esempio 1

[0058] Nel presente esperimento è stato eseguito l'isolamento delle cellule staminali retinali dalla ora terminalis di occhio umano.

[0059] La ora terminalis è stata dissociata e coltivata usando un saggio di formazione di sfera clonale, in cui le cellule staminali formano sfere derivate clonalmente. Si deve notare che le cellule staminali vengono isolate esclusivamente dal tessuto che si trova anatomicamente sotto il limbus scleroconale e praticamente in ora terminalis. Tali cellule sono state isolate con una frequenza di circa 1:500.

[0060] La biopsia del tessuto è stata quindi posta in un tubo contenente gli enzimi tripsina e ialuronidasi ed incubata in un bagno d'acqua a 37 °C per 15 minuti. Gli enzimi sono stati quindi bloccati mediante inibitori e singole cellule staminali retinali sono state successivamente isolate con isolamento meccanico mediante delicato pipettaggio. Le cellule sono state quindi contaminate in una camera emocitometrica, pellettizzate per centrifugazione e risospese in un volume appropriato di soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS) per raggiungere una concentrazione di circa 10.000 cellule per 0,5 µl. Secondo la stessa procedura precedentemente descritta, è stato eseguito l'isolamento delle cellule staminali retinali dalla ora serrata di occhi umani.

Esempio 2

[0061] Nel presente esperimento sono state valutate la proliferazione in vitro, l'auto-rinnovo a lungo termine e potenziale differenziazione delle cellule staminali retinali isolate ora terminalis (OTRSC); sono stati usati sia il saggio di formazione della sfera che il saggio monostrato.

[0062] Le singole cellule primarie ottenute dalla ora terminalis sono state piastrate in piastre a 96 pozzetti ad una densità di una cellula per pozzetto per poter testare se le OTRSC isolate erano in grado di proliferare per formare sfere derivate clonalmente. Le OTRSC hanno dato origine a sfere clonali contenenti sia cellule pigmentate che non pigmentate. Usando il saggio di passaggio di una singola sfera, le sfere primarie sono state dissociate e ripiantate, e le singole sfere hanno mostrato capacità di auto-rinnovamento, con ciascuna singola sfera che ha dato origine ad una o più nuove sfere in ciascun passaggio successivo. La regione ora terminalis dell'occhio umano contiene cellule staminali retinali che dimostrano una rispondenza al fattore di crescita in vitro simile a quella delle cellule staminali retinali isolate da ora terminalis dell'occhio di coniglio.

[0063] Le sfere clonali sono state piastrate in condizioni di differenziazione ed il potenziale di differenziazione della loro progenie è stato valutato. Le sfere hanno prodotto tutti i tipi retinali differenti (come per esempio le cellule fotorecetttrici), dimostrando così la multipotenzialità delle OTRSC isolate, che provenendo dal un'area germinativa della retina neurale sono naturalmente destinate a trasformarsi in fotorecettori. Seguendo la stessa procedura sopra descritta, sono stati studiati la proliferazione in vitro, l'auto-rinnovo a lungo termine ed il potenziale di differenziazione delle cellule staminali retinali isolate di ora serrata (OSRSC).

Esempio 3

[0064] Nel presente esperimento, è stato valutato il potenziale in vivo delle OTRSC isolate e della loro progenie. Le cellule sferiche retinali umane dissociate contenenti OTRSC sono state trapiantate nell'occhio di conigli adulti. Per visualizzare le OTRSC e la loro progenie onde trapiantarle nell'occhio del coniglio ospite, è stato preparato un costrutto lentivirale contenente una proteina fluorescente verde migliorata (EGFP). Le OTRSC sono state infettate con le particelle lentivirali che portano allo sviluppo delle sfere fluorescenti verdi. Le sfere fluorescenti verdi sono state quindi dissociate in singole cellule e risospese in soluzione salina equilibrata di Hank ad una concentrazione di 20.000 cellule per 1 µl. Successivamente, per mezzo di iniezione intra-vitrea, circa 10.000 cellule per 0,5 sono state trapiantate nella cavità vitrea di un occhio di coniglio adulto, che era stato precedentemente anestetizzato topicamente con gocce di proparacaina. Tali OTRSC sono stati iniettati usando una pipetta per somministrazione buccale modificata con barriere, per assicurare che le OTRSC del coniglio ospite non venissero contaminate. Le palpebre del coniglio ospite sono state quindi riposizionate insieme e gli animali svegliati sono stati riportati nelle loro gabbie. Trenta giorni dopo il trapianto, i conigli sono stati sacrificati ed i loro occhi sono stati enucleati e fissati in PFA (acido fosfonofarmico) al 4%; gli occhi sono stati sezionati a 14 µm su un criostato di Bright. Le sezioni di occhio sono state quindi visualizzate sotto un microscopio fluorescente per rivelare la presenza di cellule positive a EGFP, cioè OTRSC e loro progenie.

[0065] Seguendo la stessa procedura sopra descritta, è stato valutato il potenziale in vivo delle OSRSC isolate e della loro progenie.

Esempio 4

[0066] Nel presente esperimento, è stato valutato il potenziale di differenziazione in vitro delle OTRSC isolate da occhi di suino e di coniglio.

[0067] Le OTRSC sono state isolate come descritto nell'esempio 1 e quindi il loro potenziale di differenziazione è stato valutato come descritto nell'esempio 2.

[0068] Una percentuale delle cellule che migrava dalle sfere OTRSC è rimasta indifferenziata anche dopo tre settimane, ma la maggior parte delle cellule differenziate erano cellule fotorecetrici.

[0069] Gli esperimenti suddetti dimostrano che ora terminalis e ora serrata di mammiferi rappresentano una fonte fertile di cellule staminali retinali bona fide che sono caratterizzate da proliferazione in vitro, autorinnovo a lungo termine e potenziale di differenziazione.

[0070] Gli esperimenti precedenti dimostrano inoltre che OTRSC, OSRSC e rispettiva progenie sono in grado di sopravvivere in vivo, migrare, integrarsi e differenziarsi in cellule della retina neurale, ed in particolare nei fotorecettori (cioè cellule a bastoncello e cellule del cono), sopportando il tal modo l'utilità di OTRSC e/oppure OSRSC per il trattamento di malattie oppure condizioni patologiche oftalmiche.

[0071] Inoltre, l'esperimento descritto nell'esempio 2 dimostra che nel saggio di formazione della sfera ciascuna sfera deriva da una singola cellula, suggerendo che le rare cellule pigmentate nel margine cigliare sono cellule staminali non differenziate. La maggior parte delle cellule pigmentate nelle sfere erano progenitori di epitelio retinale pigmentato.

[0072] La retina neurale umana ha mostrato di contenere cellule progenitrici retinali simili alle cellule progenitrici retinali isolate dall'occhio di coniglio, assicurando il supporto all'idea che l'occhio adulto di mammifero può contenere cellule staminali retinali di derivazione precedente.

Rivendicazioni

1. Cellula staminale retinale isolata, in cui detta cellula staminale retinale è isolata dalla regione ora terminalis e/oppure dalla regione ora serrata della retina di un mammifero post-natale.
2. Cellula staminale retinale isolata secondo la rivendicazione 1, isolata da una regione della retina comprendente detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata; preferibilmente costituita da detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata; più preferibilmente costituita essenzialmente da detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata; con la massima preferenza costituita esclusivamente da detta regione ora terminalis e/oppure ora serrata e non è isolata da altre aree della retina.
3. Cellula staminale retinale isolata secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 oppure 2, che è indifferenziata e multipotente; preferibilmente è multipotente ed in grado di differenziarsi in tutti i tipi differenti di cellule retinali neurali.
4. Metodo di isolamento di una cellula staminale retinale da un mammifero post-natale, in cui il metodo comprende le fasi di:
 - (a) dissociare tutto oppure parte della ora terminalis e/oppure ora serrata dall'occhio di un soggetto,
 - (b) coltivare detta ora terminalis e/oppure ora serrata dissociata in un mezzo conduttivo alla formazione di sfere e/oppure gruppetti (cluster) di cellule comprendenti cellule staminali retinali,
 - (c) disporre le sfere risultanti e/oppure i cluster risultanti di cellule in un mezzo comprendente gli enzimi tripsina e ialuronidasi,
 - (d) bloccare gli enzimi con uno o più inibitori, e
 - (e) isolare le cellule staminali retinali risultanti dalle sfere risultanti e/oppure dai cluster di cellule risultanti.
5. Cellula staminale retinale isolata ottenuta con il metodo come definito nella rivendicazione 4.
6. Composizione farmaceutica comprendente
 - una cellula staminale retinale isolata come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 oppure ottenuta mediante il metodo come definito nella rivendicazione 4, e/oppure la sua progenie, e
 - almeno un veicolo e/oppure eccipiente farmaceuticamente accettabile.
7. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6 per iniezione intra-corpo vitreo.
8. Cellula staminale retinale isolata come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 oppure ottenuta con il metodo come definito nella rivendicazione 4, e/oppure la sua progenie, per uso come medicamento.
9. Cellula staminale retinale isolata come definita in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 oppure ottenuta con il metodo come definito nella rivendicazione 4, e/oppure la sua progenie, per uso nel trattamento di una malattia o condizione patologica oftalmica.
10. Cellula staminale retinale isolata per uso secondo la rivendicazione 9, in cui la malattia oppure condizione patologica oftalmica da trattare comprende una o più tra rinite pigmentosa, maculopatia, retinopatia diabetica, retinopatia ipertensiva e distrofie retinali.

